

**ESTUDIO DE LA GLICERÓLISIS DE
TRIOLEÍNA PARA LA PRODUCCIÓN DE
MONOGLICÉRIDOS VÍA ENZIMÁTICA
CON LIPASAS DE *CANDIDA RUGOSA*
Y DE *MUCOR MIEHEI***

**DIANA MARCELA CETINA MEDINA
COD. 8107502**

Trabajo de tesis para optar al título de Magister en
Ingeniería-Ingeniería Química

**Profesor Director
CARLOS EDUARDO ORREGO ALZATE**



**UNIVERSIDAD
NACIONAL**
DE COLOMBIA
SEDE MANIZALES
FACULTAD DE INGENIERÍA
Y ARQUITECTURA

2010

*A mis padres, mi hermana, mi familia y todos
los que me apoyaron incondicionalmente
para lograr esta meta*

AGRADECIMIENTOS

Entidades financiadoras

- ♦ Colciencias- Convocatoria Jóvenes Investigadores 2008.
- ♦ DIMA- Proyecto HERMES.
- ♦ Coordinación de la maestría en Ingeniería-Ingeniería Química.
- ♦ Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Manizales.

Profesores

- ♦ Al profesor Carlos Eduardo Orrego por su excelente acompañamiento humano e intelectual durante el desarrollo de la tesis.
- ♦ A la profesora Gloria Inés Giraldo y el Químico Aristóteles Ortiz por su colaboración con el desarrollo de la técnicas cromatográficas.
- ♦ Al profesor Víctor Haber Pérez por su amable recibimiento y colaboración durante la pasantía internacional en la Universidad Estadual do Norte Fluminense- Campos dos Goytacazes, Brasil.

Compañeros

- ♦ A la Ingeniera Química Natalia Salgado y el Ingeniero Químico Oscar Darío Hernández por su disposición y colaboración oportuna.
- ♦ Al Ingeniero Químico Juan Diego Mejía por su constante compañía y apoyo incondicional.
- ♦ A todos los compañeros de maestría en especial a Roberto Arturo Agudelo y Mario Andrés Noriega.

RESUMEN

Este trabajo se enfoca en el aprovechamiento de la glicerina, un importante residuo de la transformación oleoquímica y de la producción de biodiesel, como materia prima para la obtención de monoglicéridos, que tienen aplicación como emulsificantes para la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Los procesos convencionales emplean catalizadores químicos, de notable impacto ambiental, baja selectividad y estrictas condiciones de reacción. Mediante el empleo de catálisis enzimática es posible contrarrestar estos inconvenientes, debido a que las lipasas manejan suaves temperaturas de reacción, aumentan la selectividad y son amigables con el medio. Sin embargo, suelen ser bastante costosas con respecto a los catalizadores químicos, por lo tanto es conveniente inmovilizarlas para lograr una mayor estabilidad y reutilización.

Por lo tanto se optó trabajar con dos lipasas inmovilizadas, la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en quitosano y la lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada en resina de intercambio iónico macroporosa. Empleando un diseño experimental factorial 3^2 se evaluó el efecto de la temperatura entre 35 y 45°C, y la concentración de solventes acetona:isooctano entre 0,25:0,75 y 0,75:0,25 (v:v), en la actividad enzimática de las dos lipasas. Se encontró que la lipasa de *Mucor miehei* presentó la mayor actividad residual de 91% después de estar en contacto 24 horas con el solvente acetona:isooctano 0,75:0,25 (v:v) a 35°C. Mientras que la lipasa de *Candida rugosa* alcanzó una máximo de actividad residual alrededor de 56% después de estar 24 horas en contacto con acetona:isooctano 0,25:0,75 (v:v) entre 35 y 42°C.

Con la lipasa de *Mucor miehei* a las mejores condiciones de estabilidad se condujo la glicerólisis de trioleína variando la actividad de agua inicial del biocatalizador (a_w), la relación molar glicerina/trioleína y la cantidad de proteína según un diseño compuesto central rotatorio en cinco niveles y se siguió la producción de monoleína, dioleína y ácido oleico y la conversión de trioleína mediante diversas técnicas cromatográficas durante 24 horas de reacción, encontrando que a una $a_w=0.61$, relación molar=2,88 y cantidad de proteína=90 mg se lograron rendimientos de 68% superiores al proceso comercial (40-60%).

Palabras claves: Monoglicéridos, lipasas de *Candida rugosa* y de *Mucor miehei*, medio orgánico

ABSTRACT

This work focuses on the use of glycerin, a major residue from oleochemical processing and biodiesel production, as feedstock for the production of monoglycerides, which have application as emulsifiers for the food, pharmaceuticals and cosmetics industries. Conventional processes employ chemical catalysts of considerable environmental impact, low selectivity and strong reaction conditions. Through the use of enzymatic catalysis, it is possible to counteract these disadvantages since lipases are handled with low reaction temperatures, its use increases the selectivity and are friendly to the environment. However, the lipases usually are quite expensive compared to chemical catalysts, so it is convenient to immobilize them to achieve greater stability and reusability.

In this order of ideas, two lipases were selected to work with, lipase from *Candida rugosa* immobilized on chitosan and lipase *Mucor miehei* immobilized on a macroporous ionic exchange resin. Using a 3^2 factorial experimental design, the effect of temperature between 35 and 45°C and solvent concentrations of acetone:isooctane between 0,25:0,75 and 0,75:0,25 (v:v) were evaluated on the activity of the lipase. Lipase from *Mucor miehei* showed the higher residual activity (91%) after being in contact 24 h with the solvent acetone:isooctane 0,25:0,75 (v:v) at 35°C. Meanwhile, lipase from *Candida rugosa* reached a maximum residual activity around 56% after 24 h contact with solvent acetone:isooctane 0,25:0,75 (v:v) between 35 and 45°C.

Using the best stability conditions for lipase from *Mucor miehei*, the glycerolysis of trioleína was carried out varying the biocatalyst initial water activity (a_w), the molar ratio of glycerin/trioleína and the amount of protein using a rotating central composite design in five levels during 24 h. The production of monoolein, diolein and oleic acid were followed by several chromatographic techniques during the reaction, finding that at $a_w = 0,61$, molar ratio = 2,88 and amount of protein = 90 mg, monoolein yields over 68% higher than the commercial process (40-60%) are obtained.

Keywords: Monoglycerides, lipases from *Candida rugosa* and *Mucor miehei*, and organic medium.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ESTADO DEL ARTE	16
2.1 Glicerina	16
2.1.1 Propiedades físico-químicas	17
2.1.2 Grados comerciales	18
2.1.3 Historia, mercado y aplicaciones comerciales.....	19
2.2 Transformación de glicerina en monoglicéridos	22
2.3 Catalizadores en la producción de monoglicéridos	24
2.3.1 Catalizadores químicos	24
2.3.2 Biocatalizadores	25
2.3.3 Inmovilización de lipasas.....	27
2.3.4 Actividad enzimática.....	29
2.4 Solventes orgánicos en la producción de monoglicéridos	30
2.5 Conclusiones.....	32
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
3.1 Hipótesis.....	34
3.2 Objetivo General	34
3.3 Objetivos Específicos	34
4. METODOLOGÍA GENERAL	35
4.1 Inmovilización de enzimas.....	36
4.2 Estabilidad enzimática en solventes orgánicos	36
4.3 Glicerólisis de trioleína	36
5. INMOVILIZACIÓN DE LIPASA DE <i>CANDIDA RUGOSA</i> EN SOPORTES DE QUITOSANO	37

5.1 Materiales y métodos	37
5.1.1 Reactivos	37
5.1.2 Producción de los soportes de quitosano.....	37
5.1.3 Inmovilización de lipasa de <i>Candida rugosa</i>	38
5.1.4 Carga de proteína	39
5.2 Análisis y resultados.....	41
5.3 Conclusiones.....	41
 6. ESTABILIDAD ENZIMÁTICA EN MEDIO ORGÁNICO	42
6.1 Materiales y métodos	42
6.1.1 Reactivos	42
6.1.2 Selección de los solventes	42
6.1.3 Actividad sintética enzimática	43
6.1.4 Diseño experimental.....	44
6.2 Análisis y resultados.....	46
6.2.1 Ajuste de la actividad de agua inicial (a_w) de las lipasas	46
6.2.2 Actividad sintética inicial de las lipasas evaluadas.....	46
6.2.3 Retención de actividad enzimática en medio orgánico.....	46
6.2.4 Ajuste de los modelos y análisis de varianza (ANOVA)	47
6.2.5 Efecto de los parámetros en la retención de actividad de las lipasas de <i>Mucor miehei</i> y de <i>Candida rugosa</i>	50
6.3 Conclusiones.....	54
 7. GLICERÓLISIS DE TRIOLEÍNA	56
7.1 Materiales y métodos	56
7.1.1 Reactivos	56
7.1.2 Procedimiento para fijar la actividad de agua (a_w)	57
7.1.3 Condiciones de reacción	57
7.1.4 Diseño experimental.....	58
7.1.5 Métodos analíticos	59
7.2 Análisis y resultados.....	61
7.2.1 Seguimiento de la glicerólisis de trioleína	61

7.2.2	Ajuste de los modelos y análisis de varianza (ANOVA)	63
7.2.3	Efecto de los parámetros en la producción de monoleína.....	70
7.2.4	Efecto de los parámetros en la producción de dioleína.....	73
7.2.5	Efecto de los parámetros en la producción de ácido oleico	75
7.2.6	Efecto de los parámetros en la conversión de trioleína.....	78
7.3	Conclusiones.....	80
8.	CONCLUSIONES GENERALES.....	81
9.	RECOMENDACIONES.....	82
10.	REFERENCIAS	83
11.	ANEXO 1. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS	90
11.1	Método Biuret. Carga de Proteína.....	90
11.2	Actividad Enzimática	91
11.3	Ácidos Grasos Libres	92
12.	ANEXO 2. SEGUIMIENTO DE LAS REACCIONES DE GLICERÓLISIS	93

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 2.1 Principales propiedades físicas del glicerol [6]	17
Tabla 2.2 Grados comerciales de la glicerina [7].....	18
Tabla 5.1 Eficiencia de carga de proteína en 10 g de soporte de quitosano	41
Tabla 6.1 Log P_{Mezcla} para las mezclas de solventes acetona:isooctano evaluadas	43
Tabla 6.2 Niveles codificados y reales de las variables usadas en el diseño experimental	45
Tabla 6.3 Matriz de diseño experimental para la determinación de la estabilidad enzimática.....	45
Tabla 6.4 Actividad sintética inicial de las lipasas medida a partir de la transesterificación de pNPP.....	46
Tabla 6.5 Resultados obtenidos en el diseño experimental para la evaluación la estabilidad enzimática en medio orgánico de las lipasas evaluadas	47
Tabla 6.6 Resultados del análisis de varianza para cada modelo de estabilidad enzimática empleando Design-Expert 8.0	48
Tabla 6.7 Modelos empíricos para las variables de respuesta en función de la temperatura (T) y la fracción de acetona en la mezcla de solventes (Ac).....	48
Tabla 7.1 Actividades de agua (a_w) sobre soluciones acuosas saturadas de algunas sales a 25°C [87]	57
Tabla 7.2 Niveles codificados y reales usados en el diseño experimental	58
Tabla 7.3 Matriz de diseño experimental para la reacción de glicerólisis	59
Tabla 7.4 Valores de las variables de respuesta de la matriz de diseño experimental como función de Gli/Trio, a_w y Prot.	64
Tabla 7.5 Resultados del análisis de varianza para cada modelo de composición final de la glicerólisis empleando Design-Expert 8.0.....	65

Tabla 7.6 Modelos empíricos para las variables de respuesta en función de la actividad de agua (a_w), la relación molar glicerina/trioleína (Gli/Trio) y la cantidad de proteína en el medio de reacción (Prot).....	66
---	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 Precios para la glicerina refinada 99,7% en Europa y USA	20
Figura 2.2 Precio de la glicerina refinada para el año 2009 en USA.....	20
Figura 2.3 Productos químicos de valor agregado a partir de glicerol [14]	21
Figura 2.4 Estructura Monoglicéridos [19].....	23
Figura 2.5 Mecanismo de Reacción por Esterificación Directa[21]	23
Figura 2.6 Mecanismo de Reacción por Transesterificación [21].....	24
Figura 2.7 Estructura y función de una enzima [24].....	26
Figura 2.8 Métodos de inmovilización de enzimas.....	28
Figura 2.9 Estructuras idealizadas de la quitina (a) y la quitina 100% desacetilada (b). El quitosano es un copolímero intermedio entre (a) y (b). En (c) se muestran las unidades básicas del quitosano -76% de grado de desacetilación usado en este trabajo.	29
Figura 4.1 Metodología general de trabajo	35
Figura 5.1 Producción de lipasa de <i>Candida rugosa</i> inmovilizada en soporte de quitosano (a) Gel de quitosano en moldes (b) Enzima en solución buffer (c) Lipasa de C.R inmovilizada en quitosano (d) Medida espectrofotométrica de la carga de proteína.....	40
Figura 6.1 Variación de la coloración amarilla de las muestras según la concentración de pNP liberado en la prueba de actividad	44
Figura 6.2 Datos de porcentaje de retención de actividad experimentales contra datos predichos por el modelo para las lipasas (a) <i>Mucor miehei</i> (b) <i>Candida rugosa</i>	50

Figura 6.3 Resultados gráficos del análisis de los datos experimentales de R.A. de la lipasa de *Mucor miehei* (a) Gráfica de Contorno (b) Superficie de Respuesta ..51

Figura 6.4 Resultados gráficos del análisis de los datos experimentales de la lipasa de *Candida rugosa* (a) Gráfica de Contorno (b) Superficie de Respuesta ..52

Figura 7.1 Formación de dos fases en la determinación de ácido oleico mediante método colorimétrico.....60

Figura 7.2 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,5$, Gli/Trio=3 y Prot=90 mg donde se presentó la más alta producción de monoleína. Tres repeticiones centrales.....62

Figura 7.3 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,11$, Gli/Trio=3 y Prot=90 mg donde se presentó la más baja producción de monoleína.....62

Figura 7.4 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,73$, Gli/Trio=4,2 y Prot=125,71 mg donde se presentaron las mayores producciones de dioleína y ácido oleico.63

Figura 7.5 Datos de porcentaje de composiciones finales experimentales contra predichos por el modelo (a) Trioleína (b) Monoleína (c) Dioleína (d) Ácido Oleico69

Figura 7.6 Efecto sobre la producción de monoleína de a_w y de Gli/Trio a una cantidad de proteína óptima fija de 82,28 mg70

Figura 7.7 Efecto sobre la producción de monoleína de Gli/Trio y Prot a una actividad de agua óptima fija de 0,645.....71

Figura 7.8 Efecto sobre la producción de monoleína de a_w y Prot a una relación molar óptima fija de 2,88.....71

Figura 7.9 Efecto sobre la producción de dioleína de la a_w y Gli/Trio a una cantidad de proteína fija de 119,78 mg.....73

Figura 7.10 Efecto sobre la producción de dioleína de Gli/Trio y Prot a una actividad de agua óptima fija de 0,82.....74

Figura 7.11 Efecto sobre la producción de dioleína de a_w y Prot a una relación molar óptima fija de 4,14.....74

Figura 7.12 Efecto sobre la producción del ácido oleico de la a_w y Gli/Trio a una cantidad de proteína fija de 143,64 mg.....76

Figura 7.13 Efecto sobre la producción de ácido oleico de Gli/Trio y Prot a una actividad de agua óptima fija de 0,87.....	76
Figura 7.14 Efecto sobre la producción de ácido oleico de a_w y de Prot a una relación molar óptima fija de 4,09	77
Figura 7.15 Efecto sobre la conversión de trioleína de la a_w y Gli/Trio a una cantidad de proteína fija de 108,97 mg.....	78
Figura 7.16 Efecto sobre la conversión de trioleína de Gli/Trio y Prot a una actividad de agua óptima fija de 0,73.....	79
Figura 7.17 Efecto sobre la conversión de trioleína de a_w y de Prot a una relación molar óptima fija de 3,31	79
Figura 11.1 Curva patrón para el cálculo de la carga de proteína en el soporte de quitosano	90
Figura 11.2 Curva patrón para determinar la actividad enzimática de las lipasas en estudio a partir de la transesterificación de pNPP.	91
Figura 11.3 Curva patrón para identificación de ácido oleico.....	92
Figura 12.1 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de <i>Mucor miehei</i> de $a_w=0,73$, Gli/Trio=1,8 y Prot=125,71 mg.	93
Figura 12.2 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de <i>Mucor miehei</i> de $a_w=0,27$, Gli/Trio=1,8 y Prot=125,71 mg.	94
Figura 12.3 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de <i>Mucor miehei</i> de $a_w=0,27$, Gli/Trio=1,8 y Prot=54,25 mg...	94
Figura 12.4 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de <i>Mucor miehei</i> de $a_w=0,73$, Gli/Trio=1,8 y Prot=54,29 mg...	95
Figura 12.5 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de <i>Mucor miehei</i> de $a_w=0,27$, Gli/Trio=4,2 y Prot=54,25 mg...	95
Figura 12.6 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de <i>Mucor miehei</i> de $a_w=0,73$, Gli/Trio=4,2 y Prot=54,29 mg...	96
Figura 12.7 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de <i>Mucor miehei</i> de $a_w=0,27$, Gli/Trio=4,2 y Prot=125,71 mg.	96

Figura 12.8 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,5$, Gli/Trio=3 y Prot=30 mg.....97

Figura 12.9 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,5$, Gli/Trio=1 y Prot=90 mg.....97

Figura 12.10 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,5$, Gli/Trio=5 y Prot=90 mg.....98

Figura 12.11 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,894$, Gli/Trio=3 y Prot=90 mg.....98

Figura 12.12 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,5$, Gli/Trio=3 y Prot=150 mg.....99

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los subproductos del proceso de fabricación de biodiesel es la glicerina. Con la puesta en marcha de políticas de estímulo a la producción de biocombustibles en varios países del mundo, dentro de las que se incluye Colombia, a la vez que se incrementa la producción de biodiesel la oferta de la glicerina también lo hace, circunstancia que ha puesto su precio a niveles muy bajos. Simultáneamente y por la misma razón, en nuestro país los cultivos de palma han permitido alcanzar una producción de aceite estimada para 2010 en 1,2 millones de toneladas, con una meta de 2,0 millones de toneladas en 2015 [1]. Al fraccionar el aceite de palma se obtienen la oleína y la estearina de palma. La primera de ellas es un triglicérico rico en trioleína, de calidad comparable a otros aceites mono-insaturados como el de oliva y el de canola.

Los monoglicéridos son emulsificantes de amplio uso en las industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria en donde también han encontrado uso como sustitutos de grasas.

La disponibilidad en nuestro país de glicerina, aceite de palma y oleína permite prever que la producción de monoglicéridos que utilicen esas materias primas es una oportunidad valiosa como aporte a la generación de aprovechamiento de valor agregado en el sector palmero, de productores de biodiesel y otras industrias como la alimentaria.

El grupo de investigación de Alimentos- Frutales tiene apreciable experiencia en la transformación biocatalítica de triglicéridos. Este trabajo de tesis de maestría pretende aprovechar el contexto favorable mencionado en relación con algunas materias primas nacionales disponibles y la experticia previa en la catálisis con lipasas en fase no acuosa, para desarrollar un estudio de la glicerólisis de trioleína con el propósito principal de encontrar las condiciones en las que se produce la máxima conversión de los sustratos en monooleína, usando para ello dos biocatalizadores inmovilizados: los sistemas lipasas de *Candida rugosa*/quitosano y *Mucor miehei*/resina macroporosa de intercambio iónico.

2. ESTADO DEL ARTE

En la última década, las materias primas renovables han jugado un papel muy importante en la búsqueda de una química más eficaz y sostenible. La irreversible disminución de los recursos fósiles y la creciente presión ambiental están causando cambios progresivos en la industria química. Es así como el uso de materias primas renovables surge como una necesidad inevitable. En medio de tal contexto se ha empezado a notar la transición hacia un sistema de producción basado en bioprocesos, que se ha denominado biorefinería, centrado en la conversión catalítica y biocatalítica de este tipo de materiales hacia diferentes productos químicos de alta demanda, y fuentes alternativas de energía como hidrógeno, biodiesel o etanol, permitiendo de esta manera la sustitución del petróleo. Los aceites vegetales y las grasas son una de las más grandes fuentes de materia prima renovable usadas en la industria química. Los beneficios más importantes de los oleoquímicos son su biodegradabilidad y su carácter no tóxico, que permite la preparación de productos que no afectan el ambiente [2].

Uno de los oleoquímicos potencialmente importante para las biorrefinerías, altamente reactivo y disponible desde fuentes renovables es la glicerina o glicerol, que se obtiene como co-producto en la producción de biodiesel a partir del proceso de transesterificación de aceites vegetales o grasas animales, y como co-producto en la elaboración de jabones.

2.1 Glicerina

La glicerina constituye el subproducto más importante en la producción oleoquímica (65%). Mientras, la industria de biodiesel genera 1 kg de glicerina cruda por cada 9 kg de biodiesel producido. Se ha establecido que el costo de producción de biodiesel varía inversamente proporcional con la variación del precio de venta de la glicerina en el mercado [3-4]. Esta dependencia ha hecho que el precio de la glicerina en el mercado sea muy sensible al incremento de producción de este biocombustible. Si la producción de biodiesel continúa aumentado, como es de esperarse, el suministro de glicerina excederá de lejos su demanda. Evidencia de esto, es el bajo precio que alcanzó la glicerina cruda a finales del 2006 y mediados del 2007, época en la que llegó a 2 y 6-10 centavos de dólar por libra, respectivamente [5]. Aunque en Colombia en marzo de 2010, existen seis plantas de producción de biodiesel, aun no se ha enfrentado sistemáticamente el problema del exceso de producción de glicerina, inevitable para esta industria. Entonces es necesario encontrar alternativas eficientes de transformación de glicerina hacia productos de valor agregado y alta demanda.

Por todo lo anterior se han estado evaluando diferentes caminos para la transformación de glicerina como la oxidación, hidrogenación, eterificación, reformado, gasificación, reducción, halogenación, esterificación y transesterificación, en presencia de catalizadores homogéneos o heterogéneos. Además el glicerol también puede actuar como sustrato en procesos de bioconversión con enzimas o bacterias.

2.1.1 Propiedades físico-químicas

La molécula de glicerina o glicerol (1,2,3-Propanotriol) es un trialcohol que posee dos grupos hidroxilos primarios y uno secundario, lo que la hace altamente reactiva. Es soluble en agua, claro, casi incoloro, inoloro, viscoso, higroscópico, con una gravedad específica de 1.261 g mL^{-1} , temperatura de fusión de 18.2°C y una temperatura de ebullición de 290°C , acompañada por descomposición. La glicerina es virtualmente no tóxica para la salud humana y para el ambiente. La clave de la versatilidad de la glicerina es debida a la combinación particular de sus propiedades fisicoquímicas (Tabla 2.1), la compatibilidad con muchas otras sustancias y su fácil manipulación.

Tabla 2.1 Principales propiedades físicas del glicerol [6]

Propiedades Físicas			
Apariencia	Incoloro a marrón	Densidad de Vapor	3,17 (Aire=1)
Solubilidad en Agua	Soluble	Punto de Flash	> 160°C
Olor	Inoloro a suave	Punto de Ebullición	290°C
Gravedad específica	1,26 (Agua=1)	Punto de Fusión	$17,9^\circ\text{C}$
Presión de Vapor	0,0025 mmHg a 50°C	Peso molecular	92,1 g/gmol

La glicerina ha encontrado más de 1500 usos finales o aplicaciones de grandes volúmenes, ya sea como un ingrediente o en la transformación hacia productos cosméticos, artículos de tocador, cuidado personal, medicamentos y productos alimenticios.

La glicerina se encuentra abundantemente en la naturaleza en forma de triglicéridos, una combinación química de glicerina y ácidos grasos, constituyendo en promedio alrededor del 10% de estos materiales, que son los principales constituyentes de casi todos los aceites vegetales y grasas animales. Industrialmente la glicerina se ha obtenido de las grasas y aceites que han sido saponificados, hidrolizados o transesterificados y como subproducto de la producción de biodiesel. También puede ser producida por fermentación o hidrogenólisis de carbohidratos, pero estas rutas no son utilizadas actualmente,

sin embargo ellas fueron utilizadas durante la primera y segunda guerra mundial en Europa. La glicerina, ya sea recuperada a partir de triglicéridos o de procesos de síntesis química se usa principalmente como un producto purificado y refinado según los requerimientos comerciales. La glicerina puede ser purificada por procesos de destilación o de intercambio iónico.

2.1.2 Grados comerciales

Comercialmente se conocen varios grados de glicerina. Algunos ejemplos de grados comerciales de la glicerina y sus especificaciones se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Grados comerciales de la glicerina [7]

ESPECIFICACIONES	USP (United States Pharmacopeia)	CP (Chemically Pure)	DYN (Dynamite)	Alta Gravedad
Apariencia	Jarabe claro, casi incoloro	Jarabe claro, casi incoloro	Jarabe claro, casi incoloro	Jarabe claro, casi incoloro
Aplicaciones	Alimenticias, cosméticas y farmacéuticas	Alimenticias, cosméticas y farmacéuticas	Explosivos	Propósitos industriales
Contenido de glicerol	>95%	>99%	>98,7%	>98,7%
Gravedad específica a 30/30°C	1,2552	1,2552	1,2571	1,2587-1,2595
Color de lectura en la escala Lovibond expresado en (y+ R)	1,0	1,0	5,0	3,5
Cenizas	<0,01%	<0,01%	<0,025%	<0,05%
Hierro (como Fe) ppm	---	<0,5	---	<2,0
Cloruros (como Cl) ppm	<10	<10	<30	<60
Sulfatos (como SO₄) ppm	---	<10	<34	---
Ésteres y ácidos grasos	---	<0,03%	<0,05%	---
Reglamentación	United States Pharmacopeia y European Pharmacopeia II	Chemically Pure Glycerol, BS 2625:1979, de la British Standards Institution	Especificación 21D de Nobel Explosives Company Ltd.	Standard Specification for High-Gravity Glycerin, D-1257 de la ASTM.

En algunas ocasiones se utilizan también términos genéricos como “glicerina de saponificación 88%” y “lejía de jabón 80%” para designar diferentes grados de glicerinas crudas recuperadas de triglicéridos. Los porcentajes se refieren al contenido de glicerol de los crudos. El crudo de saponificación es un concentrado del “agua dulce” de la hidrólisis de grasas. El crudo de lejía de jabón es el producto del paso de la lejía de jabón por un evaporador desalinizador. Estos grados de glicerina casi nunca son empleados en procesos, excepto después de su refinación [7].

2.1.3 Historia, mercado y aplicaciones comerciales

La glicerina fue descubierta accidentalmente por el químico sueco K.W. Scheele en el año 1779 mientras calentaba una mezcla de aceite de oliva y litargirio, una forma mineral natural del óxido de plomo II (PbO) [8]. Scheele después estableció que otros metales y glicéridos producen la misma reacción química, la cual produce glicerina y jabón. El método Scheele fue usado para producir glicerina comercialmente por varios años. Este compuesto se volvió económicamente importante debido a la industria militar, cuando Alfred Nobel inventó la dinamita en 1886 [9].

La venta de glicerina cruda por parte de los productores de biodiesel ha generado una vertiginosa caída en su precio. El suministro de glicerina cruda casi se ha duplicado, mientras que la demanda del producto se ha mantenido en gran medida sin cambios. Para la glicerina refinada (99,7%) el precio ha variado de 100 USD c/lb en 1995 a menos de 40 USD c/lb en 2005 en el mercado de USA, y de 1500 EUR/tm en 1995 a 450 EUR/tm en 2005 en el mercado europeo como se observa en la Figura 2.1.

Los precios de la glicerina cruda cayeron a su punto más bajo a partir del 2006, debido a que la sobreoferta obligó a los productores de biodiesel a que recibieran precios de venta de hasta 2 USD c/lb o incluso menores por el subproducto crudo, pero desde entonces se ha notado un aumento gradual y constante en los precios del mercado debido a un aumento en la demanda de la glicerina cruda y ya para mediados del 2007 se alcanzaron precios de venta de entre 6 y 10 USD c/lb de glicerina sin refinar. Por otro lado el mercado y los precios de la glicerina refinada se han mantenido relativamente estables, registrando entre 30 a 40 centavos por libra, dependiendo de la calidad, grado y pureza como se muestra en la Figura 2.2 para el año 2009 [10].

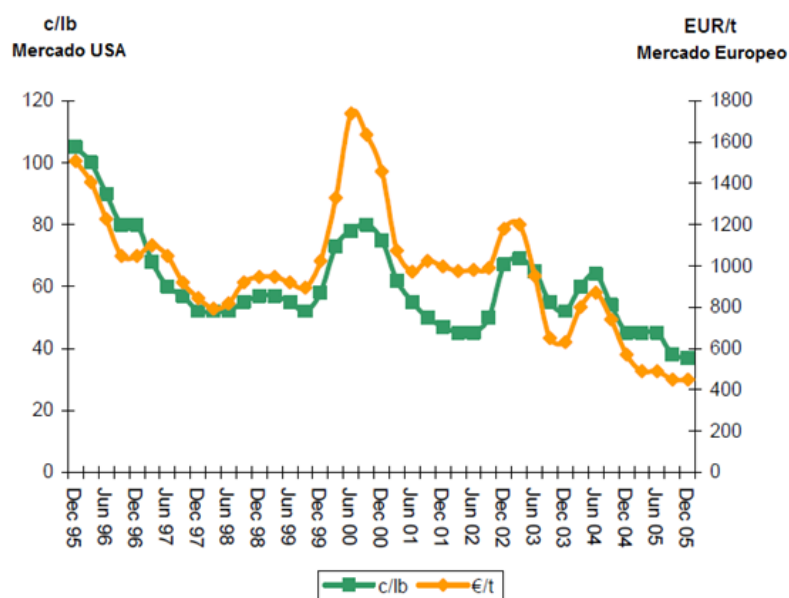


Figura 2.1 Precios para la glicerina refinada 99,7% en Europa y USA

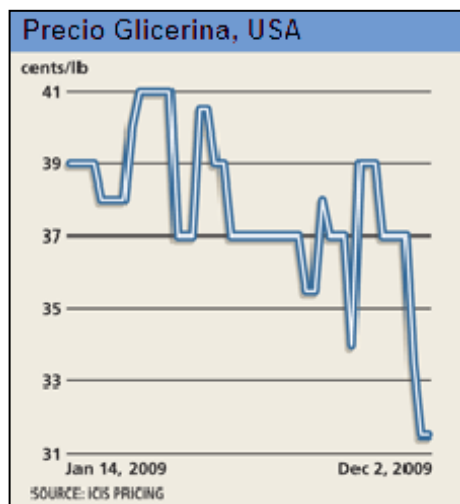


Figura 2.2 Precio de la glicerina refinada para el año 2009 en USA

Las aplicaciones comerciales tradicionales de la glicerina están relacionadas con su uso como aditivo o como material crudo, en productos alimenticios, tabaco, fármacos, para la síntesis de trinitroglicerina, resinas alquídicas y poliuretanos. Para el año 2008 la cantidad de glicerina que es destinada para aplicaciones técnicas es alrededor de 160000 ton y se espera una velocidad de crecimiento anual de 2.8%. Los sectores consumidores de glicerina son las industrias farmacéutica (18%), cuidado personal (pastas dentífricas y cosméticos 16%), manufactura de polieter/poliolios (14%), alimentos (11%), triacetinas (10%), resinas alquídicas (8%), tabaco (6%), detergentes (2%), celofan (2%) y explosivos (2%), la

Aunque la glicerina puede aprovecharse energéticamente como combustible, resulta más ventajoso transformarla en productos de mayor valor comercial. Su naturaleza altamente funcional implica que el glicerol puede ser fácilmente oxidado, reducido, halogenado, eterificado y esterificado para obtener diferentes productos químicos de valor agregado (Figura 2.3), tales como dihidroxiacetona, ácido mesoxálico, 1,3-propanodiol, 1,3-dicloropropanol, éteres de glicerol, glicerol carbonato y ésteres de glicerol [14].

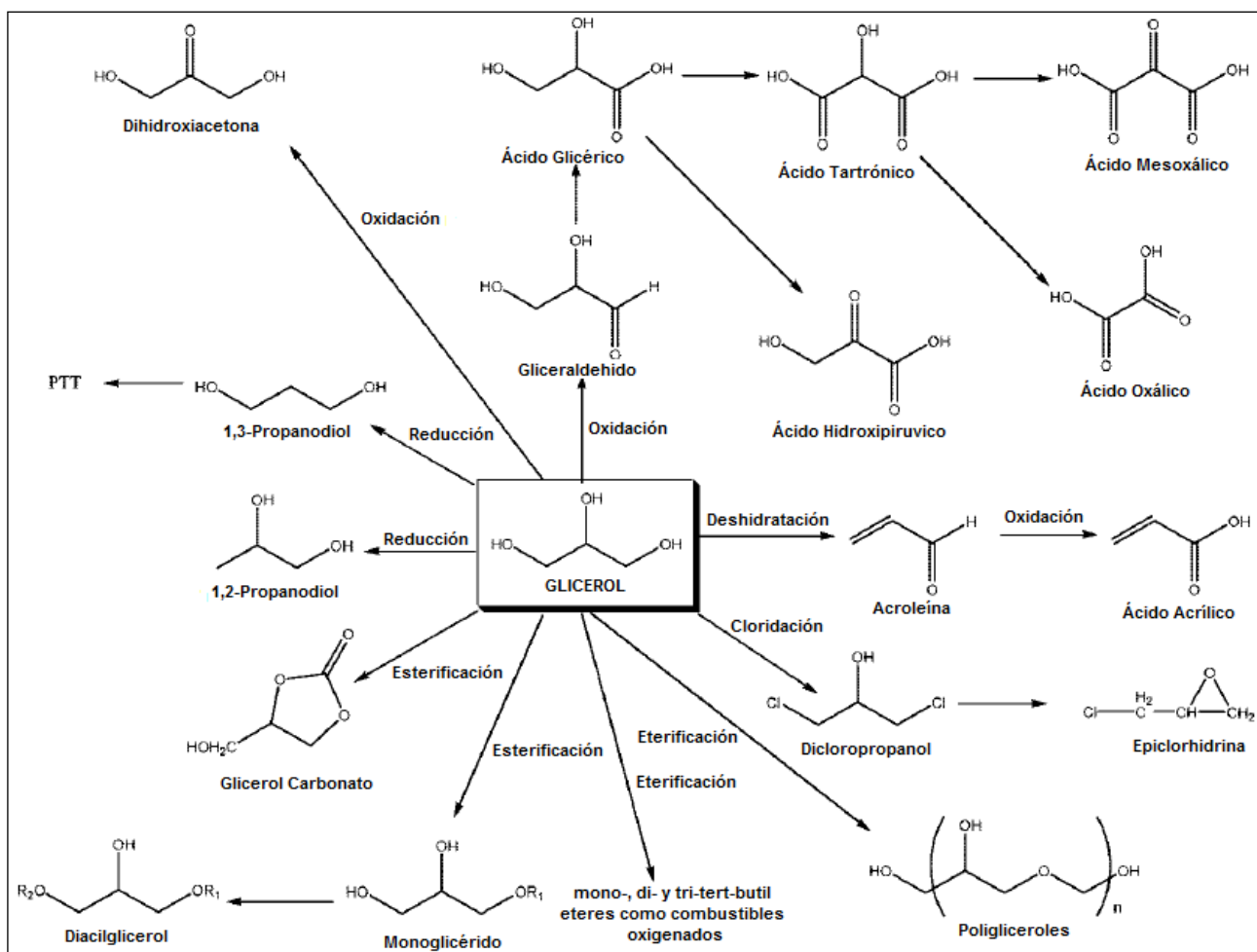


Figura 2.3 Productos químicos de valor agregado a partir de glicerol [14]

Actualmente se realizan diversas investigaciones acerca de la producción de hidrógeno por reformado de la glicerina en fase acuosa [15] y producción de hidrógeno a partir de glicerina vía fermentativa. Así mismo existen estudios acerca de la producción de metanol a partir de glicerina. La glicerina también puede ser empleada para producir ácido succínico, glicol propileno y otros bioquímicos. Una de las alternativas más recientes, consiste en la transformación de la glicerina en productos que puedan sustituir parcialmente al gasóleo de automoción, por lo que pueden considerarse, a su vez, biodiesel, en este contexto, la glicerina puede transformarse en dos tipos de productos diferentes: éteres de glicerina, a partir de su eterificación con olefinas ligeras; o ésteres de glicerina, a partir de su esterificación con ácidos carboxílicos o su transesterificación con ésteres [16].

2.2 Transformación de glicerina en monoglicéridos

La producción de ésteres de ácidos grasos tiene gran interés dadas sus propiedades emulsificantes. Las aplicaciones no sustituibles en alimentos y bebidas, y el creciente uso en productos de cuidado personal de los emulsificantes, continúan impulsando la expansión del mercado. Estados Unidos tiene el más grande mercado de emulsificantes seguido por Europa, en conjunto representan cerca del 65% en términos de volumen. El 75% de la producción de emulsificantes está basada en monoglicéridos, diglicéridos, y mezcla de los dos [17]. Se espera que el mercado de emulsificantes alcance un valor de USD 731 millones en el 2010, y el de monoglicéridos, que representan el más amplio segmento, llegue a USD 357 millones [18].

Los monoglicéridos se forman cuando en una molécula de glicerina, un grupo hidroxilo es reemplazado por un ácido graso, pueden ser 1(o alfa)-monoglicéridos o 2(o beta)-monoglicéridos dependiendo de la posición del ácido graso (Figura 2.4) [19].

En la industria farmacéutica los monoglicéridos son usados como cohesores en tabletas y como emolientes para drogas de absorción lenta. En la industria alimenticia los monoglicéridos son los emulsificantes más comunes empleados en productos de panadería, margarinas, salsas, etc. En la industria cosmética, son usados como agentes texturizantes para mejorar la consistencia de cremas y lociones. Debido a sus excelentes propiedades lubricantes y plastificantes, los monoglicéridos son usados en procesos textiles, producción de plásticos y formulación de aceites para diferentes tipos de maquinaria [20]. Recientemente nuevos productos también usan monoglicéridos, como los nutracéuticos que son de interés porque pueden prevenir la obesidad, aterosclerosis y ayudar al tratamiento de la diabetes.

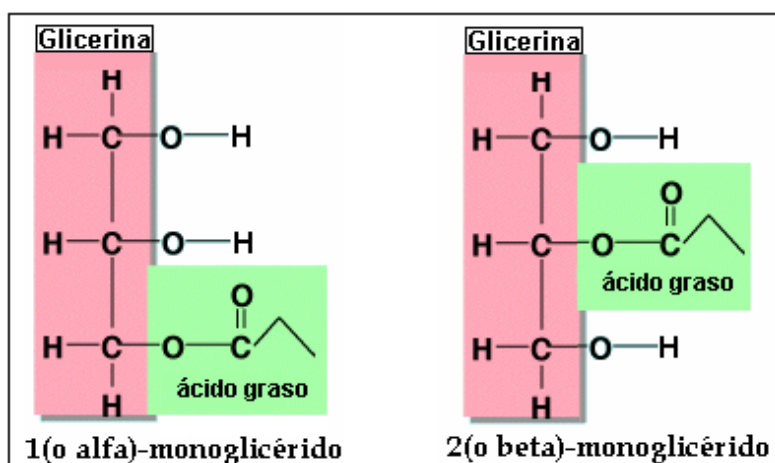


Figura 2.4 Estructura Monoglicéridos [19]

Generalmente los monoglicéridos (monoésteres de glicerina) son obtenidos a escala industrial dependiendo de la materia prima empleada, por dos rutas glicerolíticas sintéticas: partiendo de ácidos grasos, de la esterificación directa con glicerina, y partiendo de aceite puro (triglicéridos), de la transesterificación con glicerina [21].

En la esterificación directa ocurren tres reacciones simultáneas, en la primera reacción, el ácido graso y la glicerina se combinan para producir los monoglicéridos, sin embargo en la reacción secundaria se reduce la concentración de estos debido a que reaccionan a su vez con el ácido graso para producir diglicéridos, los cuales en compañía del ácido graso generan la tercera reacción en la que se obtienen triglicéridos.



Figura 2.5 Mecanismo de Reacción por Esterificación Directa[21]

La transesterificación consta de dos reacciones, en la primera el triglicérido y la glicerina se combinan para obtener monoglicéridos y diglicéridos, y en la

secundaria los diglicéridos y la glicerina reaccionan para producir nuevamente monoglicéridos [21].

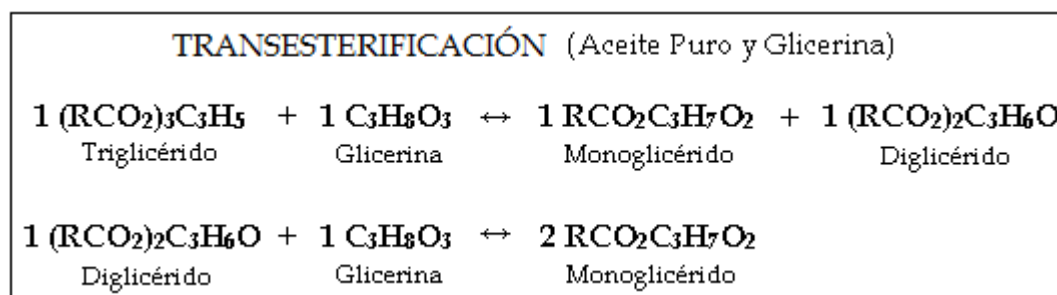


Figura 2.6 Mecanismo de Reacción por Transesterificación [21]

En ambos tipos de síntesis empleando catálisis química para mantener una alta calidad en el producto final, se debe limitar la temperatura aproximadamente entre 220°C-260°C y el tiempo de residencia en este rango de temperatura de proceso no debe exceder una hora y media, la concentración de monoglicéridos al final de la reacción está entre 40 y 60% [21].

2.3 Catalizadores en la producción de monoglicéridos

2.3.1 Catalizadores químicos

Normalmente en los procesos tradicionales para obtener monoglicéridos se emplean catalizadores homogéneos inorgánicos de notable impacto ambiental y baja selectividad hacia monoglicéridos [22]; para la esterificación directa se utiliza un catalizador ácido (sulfúrico, fosfórico o ácido sulfónico orgánico) y para la interesterificación se emplea un catalizador básico fuerte como KOH y Ca(OH)_2 [2]. En la literatura de los últimos años se reportan aluminosilicatos, zeolitas, resinas de intercambio y óxidos, básicos y ácidos, como catalizadores de la reacción de esterificación [23]. Comúnmente para el proceso llevado a cabo por cualquiera de las dos rutas, los reactivos deben ser vigorosamente agitados durante toda la reacción, y al final los catalizadores deben ser neutralizados y la mezcla de reacción debe ser enfriada rápidamente para prevenir la reversión de las reacciones [2].

2.3.2 Biocatalizadores

La búsqueda de nuevos catalizadores adecuados para el ambiente, que sean económicos y con un rendimiento comparable a los catalizadores tradicionales es de gran interés. En contraste a los procesos químicos, la glicerólisis de aceites y ácidos grasos empleando catalizadores de origen biológicos o biocatalizadores (enzimas), permite obtener rendimientos similares o incluso más altos, y mejor calidad de producto en cuanto a sabor, color y textura [17]. Las enzimas son catalizadores promisorios dadas las suaves condiciones de proceso que manejan (presión, temperatura, tiempo) y su buena conversión, selectividad y estereoespecificidad [24].

Las lipasas son enzimas de gran importancia fisiológica e industrial. De variadas masas moleculares (las más pequeñas tienen masas moleculares de 20-25 kDa –cutinasa- mientras que las más grandes son de 60-65 kDa –lipasa de *Candida rugosa*-[25]) pueden ser altamente específicas en cuanto al sustrato, y también muy selectivas con respecto a la reacción a catalizar [26-28]. Además de sus sustratos naturales, tales como los ésteres insolubles en agua y los triglicéridos, las lipasas son quizá las enzimas más usadas en medios orgánicos debido a que presentan una inherente afinidad por ambientes hidrofóbicos[29]. Estas características han llevado a que actualmente sean empleadas en el procesamiento de químicos orgánicos, formulaciones de detergentes, síntesis de biosurfactantes, en la industria oleoquímica, láctea, agroquímica, papelera, en nutrición, cosméticos, síntesis de químicos finos y de fármacos [30]. Las lipasas incrementan su actividad drásticamente cuando actúan en la interfase agua-lípido, fenómeno que se denomina activación interfacial [31]. El sitio activo en las lipasas y las esterases es una triada catalítica formada por Ser-His-Asp/Glu [32]. Para muchas lipasas se puede observar más de una conformación; en una de estas conformaciones el sitio activo es inaccesible a los sustratos debido a que se encuentra protegido por uno o más segmentos de polipéptidos y, consecuentemente, inactivando la enzima mientras esté en un entorno molecular compuesto solamente por un sustrato único [27]. En la otra, en presencia de interfases se produce una reestructuración conformacional de la lipasa lo que hace que el sitio activo se encuentre expuesto. Con diferencias muy pequeñas en las estructuras de estas enzimas se pueden promover fuertes cambios en la estructura de las lipasas abiertas y, por lo tanto, en sus propiedades catalíticas, principalmente en su selectividad [33]. La necesidad de una interfase es crítica; incluso en medio de un disolvente hidrofóbico los pequeños depósitos locales de agua remanentes dentro de la estructura plegada de la lipasa en las cercanías del sitio activo pueden proporcionar la interfase local necesaria para la activación de la enzima [34]. Una excepción a este comportamiento se ha detectado en la lipasa de la *Candida antarctica* B [25, 35]. Una propiedad importante para comprender el comportamiento de las lipasas es su punto isoeléctrico que corresponde al pH en solución al cual la carga neta superficial, y así la movilidad de la proteína es igual

a cero, todas las enzimas presentan diferentes valores de esta propiedad, en el caso de la lipasa de *Mucor miehei* se ha reportado un punto isoelectrónico de 4 [36].

Las lipasas (o acylglycerol ester hydrolases) pertenecen al grupo de las enzimas hidrolasas, para mantener su estructura requieren una cantidad de enlaces hidrofílicos que equilibran las fuerzas entre los aminoácidos. En su estructura globular, se entrelazan y se pliegan una o más cadenas polipeptídicas, que aportan un pequeño grupo de aminoácidos para formar el sitio activo, o lugar donde se adhiere el sustrato, y donde se realiza la reacción. Una enzima y un sustrato no llegan a adherirse sus formas no encajan con exactitud. Este hecho asegura que la enzima no participa en reacciones equivocadas. La enzima misma no se ve afectada por la reacción. Cuando los productos se liberan, la enzima vuelve a unirse con un nuevo sustrato. Este proceso se ilustra a continuación:

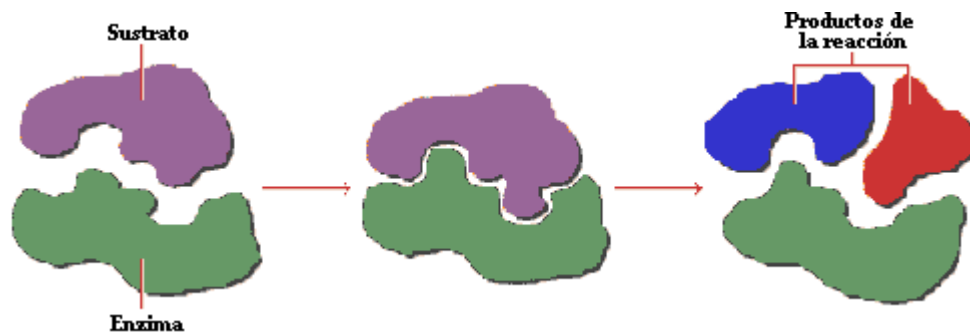


Figura 2.7 Estructura y función de una enzima [24]

Las lipasas específicamente son enzimas que sintetizan los acilglicéridos. Poseen dos conformaciones estables: Cerrada inactiva y Abierta activa, ya que poseen una tapa que cubre los sitios activos de la enzima.

La selectividad de las lipasas puede clasificarse en los siguientes tipos [24]:

- I. Lípidos:** la secuencia de lipólisis es $TG \rightarrow DG \text{ monoacilglicerol} \rightarrow \text{glicerol} + 3 \text{ Ácidos grasos libres}$. Pueden ser:
 - a. La misma enzima para cualquiera de los acilgliceroles en la secuencia.
 - b. Diferentes enzimas de la misma fuente para diferentes acilgliceroles. Por ejemplo lipasas TG, DG y MG.
- II. Regio- o posicional:** regioselectividad. Pueden ser:
 - a. Para ésteres 1+3 de TG en varios grados.
 - b. Noregion-, hidrólisis de todos los tres ésteres a aproximadamente iguales velocidades. Por ejemplo la lipasa *Cándida Antártica*.

III. Ácidos Grasos: selectividad para grupos de ácidos grasos.

IV. Estereo: la estéreoselectividad es la hidrólisis preferencial de los esteres primarios sn.

V. Combinaciones: combinaciones de varias selectividades, por ejemplo: ácidos grasos y estéreoselectividad son características de la lipasa *Geotrichum candidum*.

La principal desventaja del uso de lipasa en aplicaciones industriales alimenticias y farmacéuticas es el costo de la enzima que es muy alto porque debe estar libre de otras enzimas. Por lo tanto para hacer el proceso enzimático competitivo, las lipasas deberán ser reutilizables y estables. Esto se logra empleando la lipasa en forma inmovilizada lo que permite además operar el proceso enzimático continuamente [20].

Existen diversos artículos científicos acerca de la síntesis enzimática de monoglicéridos usando como catalizador diferentes tipos de lipasas [17, 20, 37-38] tales como *Pseudomonas sp.*, *Candida rugosa*, *Rhizopus delear*, *Mucor javanicus*, *Alcaligenes sp.* y *Chromobacterium viscosum*, en los cuales se ratifica su capacidad de igualar o mejorar el rendimiento del proceso y la selectividad hacia monoglicéridos en comparación con los procesos químicos.

2.3.3 Inmovilización de lipasas

La inmovilización de la enzima implica la deliberada restricción de su movilidad para ubicarla en una región específica rodeada por una barrera imaginaria (o material) que la separa del medio reaccionante haciéndola, al mismo tiempo, permeable a las moléculas de reactantes y productos [39]. Esta técnica busca principalmente dos objetivos: mejorar la estabilidad de la enzima y disminuir su consumo ya que puede ser regenerada y reutilizada en varios ciclos de reacciones [40].

La actividad y la estabilidad operacional de una lipasa inmovilizada dependen de su estructura molecular, del tipo de soporte y el método de inmovilización, así como de las condiciones del medio de reacción, particularmente de su actividad de agua [41].

Los métodos para la inmovilización de lipasas pueden ser diferenciados en dos categorías generales: retención física y enlace químico [42]. Entre los primeros la adsorción es el método más simple e implica interacciones superficiales reversibles entre la enzima y el material de soporte. Es muy útil en sistemas no acuosos, en los cuales la desorción puede ser despreciada debido a la baja

solubilidad de las enzimas en estos medios [39-40, 43-50]. En la Figura 2.8 esquematizan los métodos de inmovilización de enzimas.

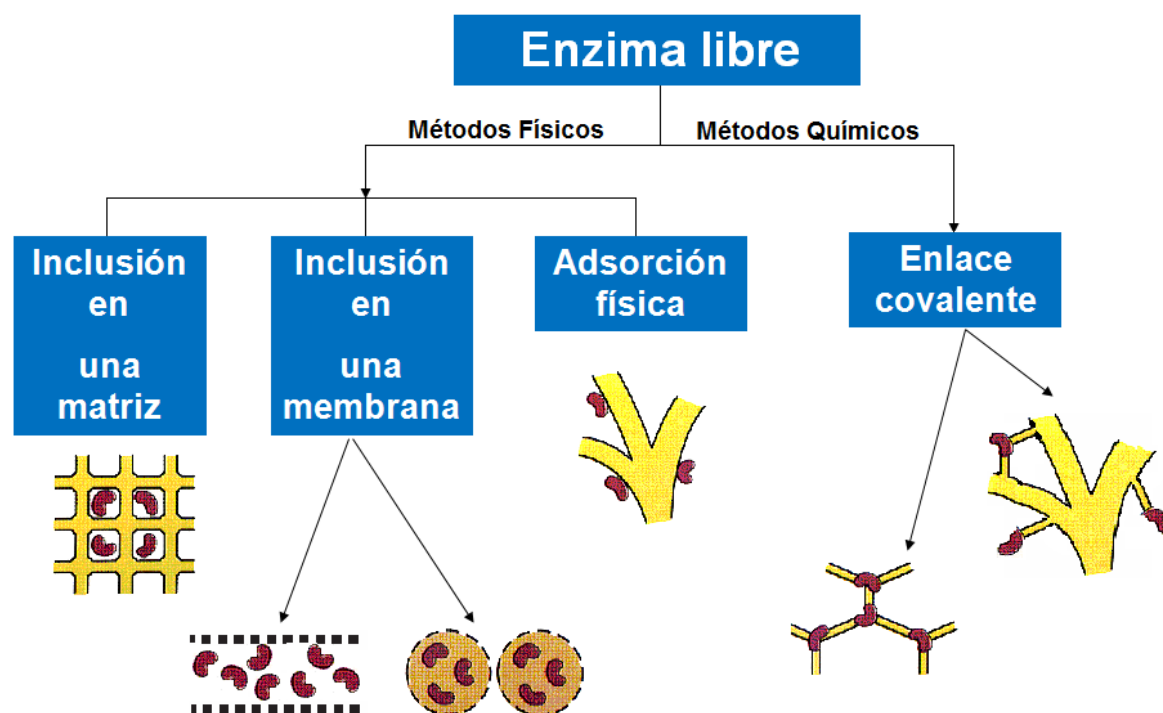


Figura 2.8 Métodos de inmovilización de enzimas

Quitosano

El quitosano es un copolímero amino polisacárido que resulta de la unión del β (1-4),2-amino-2-desoxi-D-glucano y el 2- acetamidodesoxi-D-glucano, obtenido por D-acetilación alcalina de la quitina, un polisacárido inelástico y nitrogenado, que se extrae de las paredes de algunos hongos y del exoesqueleto de algunos artrópodos como insectos, crustáceos y escarabajos. En la quitina los grupos amino C-2 son, en su estructura ideal, totalmente acetilados. La quitina y el quitosano son, consecuentemente, copolímeros de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. La quitina es insoluble en agua debido a su rígida estructura cristalina y a la red intra- e intermolecular de puentes de hidrógeno [51]. La estructura idealizada de la quitina, al igual que la estructura del quitosano se muestran en la Figura 2.9.

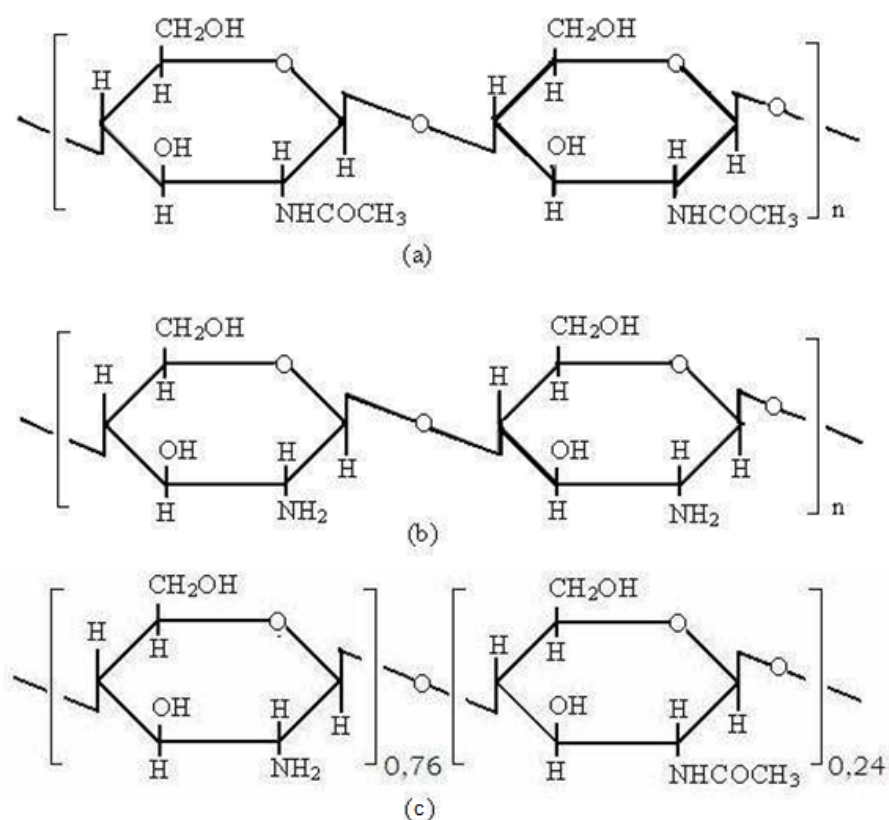


Figura 2.9 Estructuras idealizadas de la quitina (a) y la quitina 100% desacetilada (b). El quitosano es un copolímero intermedio entre (a) y (b). En (c) se muestran las unidades básicas del quitosano -76% de grado de desacetilación usado en este trabajo.

Un material considerado como soporte para la inmovilización de enzimas debe presentar ciertas características como alta afinidad por las proteínas, disponibilidad de grupos funcionales reactivos para inmovilizar enzimas y para modificaciones químicas, hidrofiliicidad, estabilidad mecánica y rigidez, regenerabilidad, y facilidad de preparación en diferentes configuraciones geométricas que proporcionen al sistema la permeabilidad y el área superficial adecuada para una biotransformación dada. El quitosano exhibe la mayoría de las características mencionadas [52].

2.3.4 Actividad enzimática

Debido a la diversidad y el incremento de nuevas aplicaciones de las enzimas, muchos métodos para cuantificar actividad enzimática son desarrollados cada año. Se ha prestado gran interés a las reacciones catalizadas por lipasas en medio no acuoso. La esterificación y transesterificación son dos reacciones típicas

catalizadas por lipasas, mediante las cuales se obtienen numerosos e importantes productos tales como sabores artificiales [53], monoglicéridos [17, 20, 37-38], bloques de construcción ópticamente puros [54] y biodiesel [55]. Sin embargo, no todas las lipasas pueden catalizar estas reacciones en solventes orgánicos, por lo tanto es necesario escoger una enzima adecuada.

La selección de la enzima depende de la determinación de la actividad, por lo cual muchos métodos diferentes han sido desarrollados [56-58]. La mayoría de ellos son basados en ensayos hidrolíticos. Sin embargo, ocurre un problema cuando las actividades sintéticas de las enzimas en solventes orgánicos no corresponden a las actividades hidrolíticas en solución acuosa [59-60], pues aquellas identificadas de alta actividad por los métodos hidrolíticos no son necesariamente las adecuadas para reacciones sintéticas. Como consecuencia, varios métodos basados en las actividades de la esterificación y la transesterificación en medio no acuoso han sido propuestos [61-63]. Muchos de estos métodos emplean cromatografía de gases, HPLC (high performance liquid chromatography) o determinaciones titrimétricas, con la desventaja de ser costosos y conllevar tiempos largos para su realización. Las determinaciones espectrofotométricas para la medida de la actividad son simples, rápidos y de bajo costo. Desafortunadamente, la mayoría de los sustratos disponibles para ensayos de actividad de lipasa exhiben características de absorbancia únicamente en una cierta fase acuosa después de la hidrólisis con lipasa. Pencreach y Baratti (2006) [64] determinaron la actividad hidrolítica de lipasa en solvente orgánico usando p-nitrofenil palmitato (pNPP) como sustrato mediante un procedimiento de extracción. Teng y Xu (2007) [65], basados en la descripción de Pencreach y Baratti, propusieron un método modificado para determinar la actividad sintética en solvente orgánico. El método está basado en la reacción de transesterificación entre pNPP y etanol catalizada por lipasa. El rendimiento de p-nitrofenol (pNP) fue detectado por un método simple espectrofotométrico y es el usado como el indicador para la determinación de la actividad sintética en este trabajo.

2.4 Solventes orgánicos en la producción de monoglicéridos

Para la bioconversión de componentes lipofílicos o insolubles en agua, es necesario introducir solventes orgánicos en los sistemas de reacción para mejorar la solubilidad de estos reactivos. Además el uso de solventes orgánicos es benéfico para la construcción de sistemas de reacción homogéneos y para facilitar el proceso en reactor continuo. Sin embargo los solventes no acuosos producen varios efectos fisicoquímicos en las moléculas de la enzima, y los efectos difieren dependiendo de sus propiedades y las enzimas usadas [66].

El coeficiente de partición octanol-agua (P), es usado en la literatura como un parámetro para caracterizar las propiedades de los solventes en relación a lípidos y lipasas. En general P (o en su forma más común de expresión, log P) provee una medida de la naturaleza lipofílica vs. hidrofílica de un compuesto. P describe la distribución de un compuesto en un sistema de dos fases y es definido como la relación de la concentración de equilibrio de un compuesto en una fase rica en 1-octanol con respecto a la concentración en una fase rica en agua. El log P tiende a ser más grande para compuestos con estructuras fuertemente no polares y más pequeño incluso negativo para componentes con muchos grupos polares [67].

Damstrup *et al.* (2005) [67] realizaron una optimización de solventes para la producción de monoglicéridos basada en la reacción de glicerólisis catalizada por lipasas, encontrando los más altos contenidos de monoglicéridos cuando se emplearon solventes con log P entre 0,3- 1,5. Solventes hidrofílicos (tales como isopropanol y etanol, con valores de log P de 0,05 y 0,30 respectivamente) presentaron rendimientos más altos hacia monoglicéridos que los solventes hidrofóbicos (tales como heptano, hexano e isooctano, con valores de log P de 4,5; 4 y 5,15, respectivamente). Por lo tanto, no sólo la polaridad, sino también los grupos funcionales juegan un papel importante en las propiedades de los solventes. El rango relativamente bajo de log P indica ambas características hidrofílicas e hidrofóbicas, con predominancia de las características hidrofílicas; estos resultados tienen concordancia con que un solvente debe tener ambas características para ser adecuado tanto con glicerol como con aceites y grasas.

Comúnmente se ha utilizado hexano puro como solvente para la obtención de monoglicéridos a partir de la esterificación directa de glicerol y ácidos grasos catalizada por lipasa, pero debido a que el glicerol es muy poco soluble en este solvente se ha presentado la obstrucción del catalizador. Para contrarrestar este problema fue propuesto inicialmente adsorber el glicerol sobre sílica gel seca. Analizando el esquema global de reacción, se observó que empleando como solvente n-hexano puro, la reacción no es selectiva y deja a los triglicéridos como el producto principal, el monoglicérido es únicamente el 6% molar de los productos totales y la conversión en el equilibrio es de 34% para diglicéridos y 60% para triglicéridos. Se demostró que un incremento en la polaridad del solvente, usando mezclas de n-hexano y 2-metil-2-butanol, mejora drásticamente la selectividad hacia la formación del monoglicérido. El uso de una mezcla equimolar de n-hexano y 2-metil-2-butanol, permite obtener un producto de 94% de monoglicéridos, 2.4% de diglicéridos y 0% de triglicéridos en el equilibrio. Este efecto positivo es opacado por un decremento en las velocidades iniciales y en la conversión del sustrato en equilibrio termodinámico [17]. En un estudio de la glicerólisis de ácido esteárico catalizada por lipasa de *Candida antártica*, en donde se probaron diferentes solventes polares, apróticos y apolares, se halló que con la acetona como medio se presentó la más alta producción de monoglicéridos [68].

La glicerólisis de triglicéridos con lipasa en la fase líquida típicamente tiene un rendimiento únicamente de 30-50% de monoglicérido, debido a un equilibrio desfavorable. Sin embargo, otros autores [66] mejoran el sistema llevando a cabo la reacción primero en un estado emulsión líquido-líquido, después enfriarlo hasta que la mezcla de reacción llegue a ser sólida. El gran incremento en la formación de monoglicéridos después de alcanzar el estado sólido fue relacionado a la cristalización del monoglicérido de la mezcla de reacción. Esto permite un desplazamiento en el equilibrio de la reacción. El rendimiento con este método incrementa a 70-99%. Sin embargo la producción continua de monoglicéridos por este método es hasta hoy imposible.

En otros casos más específicos como la obtención de monoglicéridos a partir de aceite de palma y glicerol catalizada por lipasa *Pseudomonas sp.*, se realizó una investigación [66] de diferentes solventes: hexano, isooctano y acetona, y la combinación de esos solventes, para escoger el mejor medio de reacción. Los rendimientos más altos se encontraron empleando acetona y mezcla de acetona/isooctano (3:1, v/v).

2.5 Conclusiones

La catálisis enzimática ha sido ampliamente usada para la producción de monoglicéridos en medio orgánico, se han empleado diversos tipos de lipasas tanto libres como inmovilizadas. No existe una teoría uniforme sobre la influencia de los solventes orgánicos en las reacciones biocatalíticas, la teoría más aceptada actualmente es que hay una correlación directa entre el log P y la actividad enzimática, es decir que los solventes hidrofóbicos y apolares favorecen el comportamiento catalítico de las lipasas en la reacción, esto se debe a que este tipo de solventes no despojan a la enzima del agua necesaria para permanecer en su estado activo. Sin embargo, en el caso de la reacción de glicerólisis, se ha demostrado que para favorecer la producción de monoglicéridos, es conveniente aumentar la polaridad del solvente, en algunos casos se han empleado solventes polares puros obteniendo altos rendimientos y selectividad hacia monoglicéridos.

El efecto de la temperatura y de la concentración de diversas mezclas de solventes polares y no polares, ha sido evaluado en la reacción enzimática de glicerina y múltiples tipos de sustratos. Sin embargo la estabilidad del biocatalizador en medio orgánico a temperatura fija no se ha tomado como un criterio de selección de la enzima adecuada para la glicerólisis, a pesar de que son dos parámetros que influyen significativamente el comportamiento de la lipasa en la reacción. Adicionalmente mediante este proceso de discriminación previo a la reacción se logra eliminar un poco el ruido que se genera al evaluar varios factores en un mismo diseño experimental.

La actividad enzimática de las lipasas empleadas en reacciones de glicerólisis, por lo general se ha medido mediante ensayos de hidrólisis de diferentes sustratos tales como aceite de oliva y para-nitrofenilpalmitato, entre otros. No se han empleado otros métodos para la medida de la actividad catalítica, basados en reacciones de síntesis (esterificación o transesterificación), lo cual daría una mejor aproximación del real comportamiento de la actividad enzimática en la reacción de glicerólisis.

En la mayoría de la literatura revisada, se encontró que la glicerólisis de triglicéridos, empieza a acercarse al equilibrio aproximadamente a las 24 horas de reacción.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Mediante la transesterificación de trioleína con glicerina, empleando como catalizador lipasa *Mucor miehei* inmovilizada en resina macroporosa de intercambio iónico o lipasa *Cándida rugosa* inmovilizada en quitosano, y llevando la reacción en un medio orgánico isooctano-acetona, es posible producir monoglicéridos con características similares a las del producto comercial de pureza entre el 40-60%.

3.2 Objetivo General

Estudiar diferentes parámetros de la reacción de producción de monoglicéridos mediante la glicerólisis de trioleína en medio no acuoso por vía enzimática.

3.3 Objetivos Específicos

- ♦ Evaluar la estabilidad de dos enzimas, lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada en resina de intercambio iónico y lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en quitosano, en diferentes mezclas de acetona-isooctano entre 35° a 45°C.
- ♦ Estudiar el efecto que tienen sobre la producción de monoglicéridos a partir de trioleína y glicerina, la actividad de agua inicial del biocatalizador, la cantidad de enzima inmovilizada en el medio de reacción y la relación molar de los reactivos, utilizando la lipasa y las condiciones solvente-temperatura de mayor estabilidad encontradas en el objetivo anterior.
- ♦ Estudiar el efecto que tienen sobre la producción de ácidos grasos a partir de trioleína y glicerina, la actividad de agua inicial del biocatalizador, la cantidad de enzima inmovilizada en el medio de reacción y la relación molar de los reactivos, utilizando la lipasa y las condiciones solvente-temperatura de mayor estabilidad encontradas en el objetivo específico 1.

4. METODOLOGÍA GENERAL

La metodología empleada en la realización de este trabajo se resume en el siguiente diagrama conceptual.

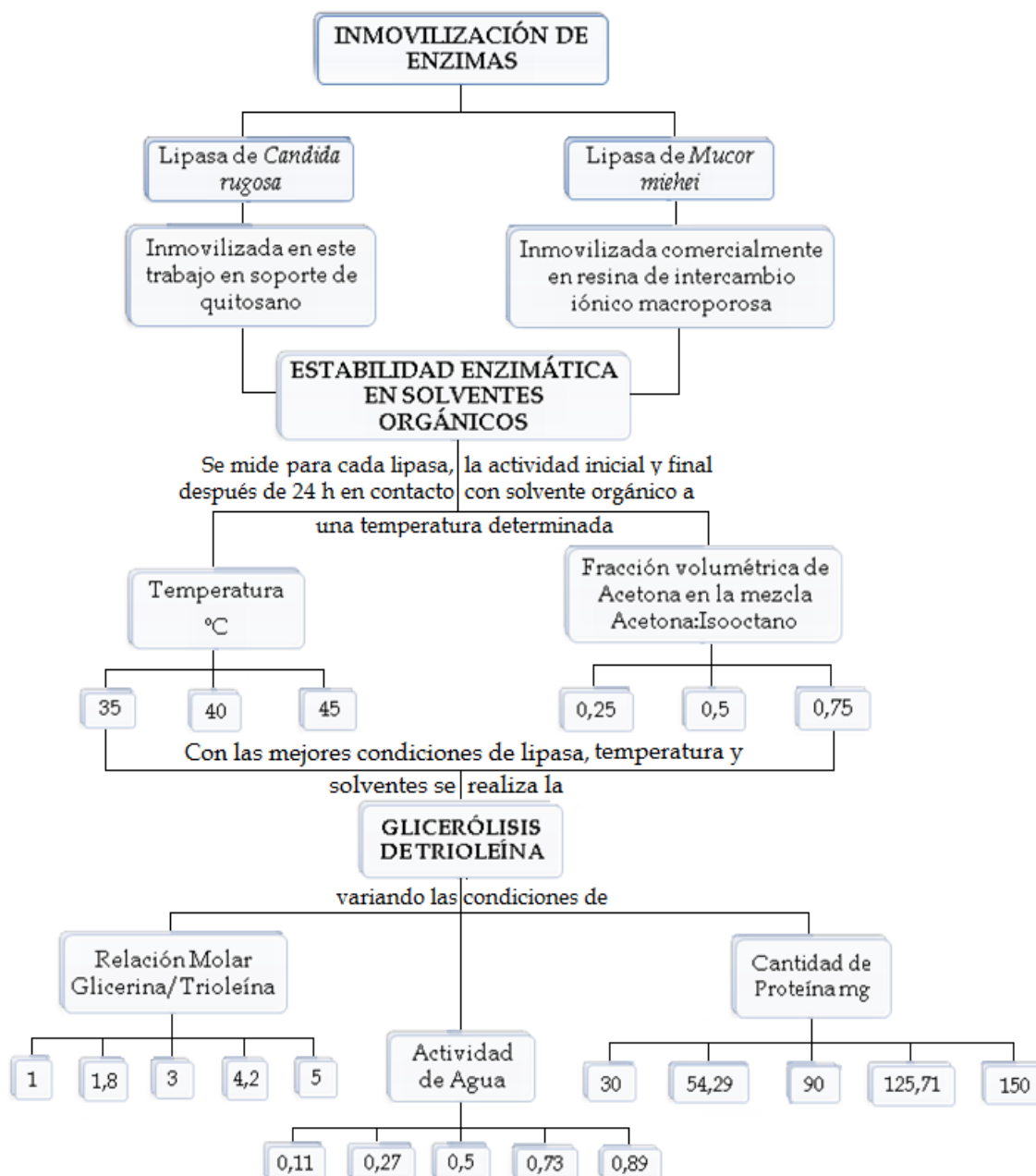


Figura 4.1 Metodología general de trabajo

4.1 Inmovilización de enzimas

Para efectos de la realización de la tesis se emplearon dos enzimas inmovilizadas: lipasa de *Candida rugosa* y lipasa de *Mucor miehei*. La lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada comercialmente en resina macroporosa de intercambio iónico, y la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en este trabajo en soportes de quitosano.

4.2 Estabilidad enzimática en solventes orgánicos

Para el cumplimiento del objetivo específico 1. Se midió la estabilidad de las dos lipasas inmovilizadas en solventes orgánicos, evaluando la actividad sintética inicial de las lipasas y la actividad final después de estar en contacto 24 horas con tres diferentes concentraciones de la mezcla acetona:isooctano (0,25:0,75; 0,5:0,5 y 0,75:0,25; v:v) a tres diferentes temperaturas (35, 40 y 45°C), siguiendo un diseño experimental planteado más adelante.

De esta forma, se eligieron para los parámetros experimentales evaluados, las mejores condiciones de medio orgánico, tipo de lipasa y temperatura para llevar a cabo la reacción de glicerólisis.

4.3 Glicerólisis de trioleína

Se estudió la reacción de glicerólisis de trioleína teniendo como parámetros fijos las condiciones elegidas en el punto anterior, y como parámetros variables la relación molar glicerina/trioleína, la actividad de agua inicial del biocatalizador y la cantidad de proteína en el medio de reacción. La evolución de la reacción se monitoreó mediante un diseño experimental, manipulando tres factores en cinco niveles cada uno, de la siguiente forma: relación molar glicerina/trioleína, 1; 1,8; 3; 4,2 y 5; actividad de agua, 0,11; 0,27; 0,5; 0,73 y 0,89; y cantidad de proteína, 30; 54,29; 90; 125,71 y 150 mg.

El seguimiento de las reacciones se hizo empleando HPLC para identificar mono-, di- y triglicéridos, y mediante un método colorimétrico para identificar los ácidos grasos libres.

5. INMOVILIZACIÓN DE LIPASA DE *CANDIDA RUGOSA* EN SOPORTES DE QUITOSANO

Con el objetivo de lograr una mayor estabilidad de la enzima y permitir su reutilización se llevo a cabo la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* sobre soportes de quitosano. La lipasa de *Mucor miehei* comercial estaba soportada en resina de intercambio iónico, por lo tanto no fue necesaria su inmovilización.

5.1 Materiales y métodos

5.1.1 Reactivos

La lipasa de *Candida rugosa*, el quitosano en hojuelas (alto peso molecular 602 kDa, grado de deacetilación 76,5%) y la albúmina bovina fueron comprados de Sigma-Aldrich, USA. El glutaraldehído (25% en agua) fue obtenido de Fisher Scientific. El ácido acético glacial grado reactivo de Merck y etanol grado técnico 96% de Panreac. Todos los demás reactivos empleados fueron grado analítico de casas comerciales reconocidas.

5.1.2 Producción de los soportes de quitosano

El procedimiento para la producción de los soportes de quitosano fue basado en trabajos previos [69-71]. Las hojuelas de quitosano (10 g) fueron diluidas en 330 mL de solución de ácido acético 1% v/v; a esta dispersión se le adicionó glutaraldehído como agente entrecruzador hasta que este alcanzara una concentración 0,0003 M. Se realizó una agitación completa hasta la formación de la dispersión coloidal, vertiéndose en moldes especiales y formando películas delgadas. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente (20°C).

Las películas fueron puestas en contacto con la solución gelificante que contenía 74% v/v de NaOH 0,5 N y 26% v/v de etanol grado industrial (96%). Este conjunto permaneció a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se colocó en un congelador a -20°C por 17 horas. Finalmente las películas se descongelaron por 3 horas a -4°C.

Una vez descongelados las películas, se desechó el líquido remanente y se procedió al acondicionamiento del pH lavándolas primero con abundante agua destilada y frotándolas suavemente. Posteriormente se sumergieron en éter etílico durante 45 min y, en seguida se sumergieron en acetona durante otros 45 min. Al

final se lavaron de nuevo con abundante agua destilada y se dejaron reposando con agua destilada a temperatura ambiente por 16 horas.

Pasado este tiempo se verifica el pH, el cual debe encontrarse cercano a 7 empleando papel indicador. Si este no se encuentra cercano a este valor se realizan más lavados con agua destilada hasta alcanzar este valor.

Después de verificar que el pH de las películas gelificadas se encontrara en un valor aproximado de 7, se deshidrataron y crioestructuraron aseguradas entre mallas, mediante su inmersión en un baño de etanol a muy baja temperatura (-50°C) para luego descongelarlas a temperatura de refrigeración (-4°C). Este procedimiento se repitió 6 veces, de acuerdo con lo propuesto por Orrego y Valencia, 2009 [69].

Una vez finalizados los ciclos de crioconcentración, las películas gelificadas se deshidrataron formando los soportes semi-secos que se pusieron nuevamente en los moldes a -4°C durante 7 días para su deshidratación completa.

Los soportes secos se cortaron en trozos de aproximadamente 1 x 1 cm².

5.1.3 Inmovilización de lipasa de *Candida rugosa*

La inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* se realizó según el procedimiento reportado en trabajos previos [71-72] usando una proporción de 1gr de soporte/50 mL de solución enzimática (1 mg de proteína/mL de solución).

La solución buffer para la preparación de la solución enzimática fue realizada según el estándar con una mezcla de Na₂HPO₄ y KH₂PO₄ para alcanzar un pH de 7,3. Posteriormente se adicionó la cantidad de enzima apropiada (2,738 g de *Candida rugosa* comercial para 10 g de soporte) de acuerdo con el contenido de proteína según resultados de análisis Kjeldhal (18,26% para la lipasa de *Candida rugosa*, Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales).

Para disolver la enzima en la solución buffer se utilizó un agitador magnético a una temperatura entre 35°C y 40°C durante 2 horas. Después se adicionaron 10 gr de soporte se deja a temperatura ambiente pero con mayor agitación durante 20 horas.

Se preparó una cantidad apreciable de lipasa inmovilizada en soporte de quitosano con el fin de tener un producto con las mismas características para ser empleado en las posteriores pruebas de estabilidad.

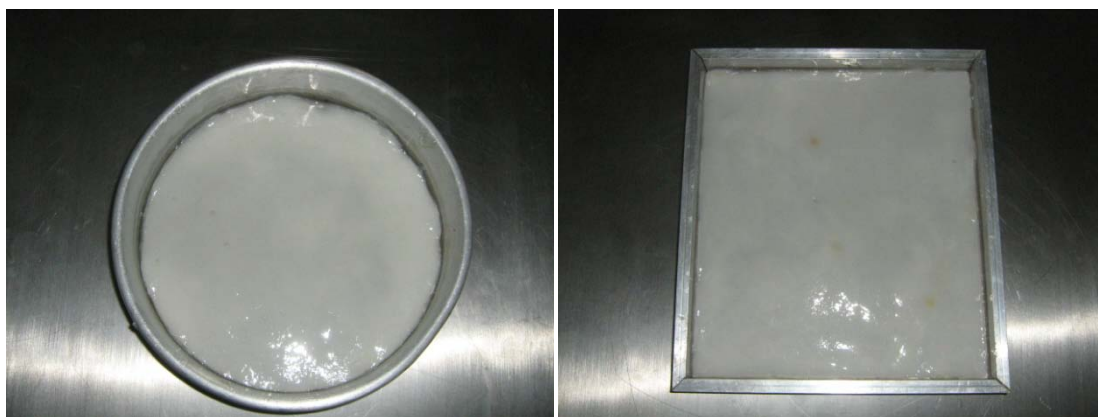
5.1.4 Carga de proteína

La cantidad de enzima inmovilizada en los soportes fue determinada con la medida de las concentraciones inicial y final de proteína en la solución enzimática de inmovilización y en las soluciones de lavado usando el método Biuret [73].

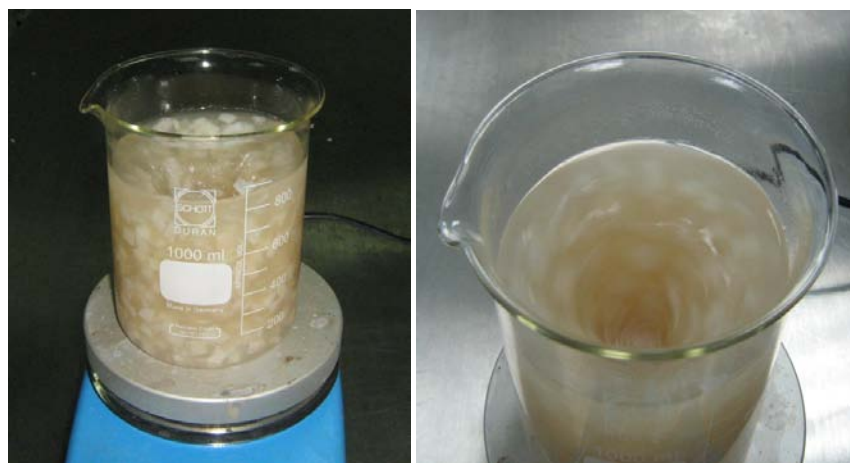
Se retiraron los soportes de la solución enzimática empleando filtración al vacío, y posteriormente se lavaron dos veces con la solución buffer. Para la medida de la cantidad de proteína, se tomaron 1 mL de la solución enzimática inicial, de las soluciones filtradas y de lavado, y de agua destilada que actúa como blanco, para ser combinadas con 4 mL del reactivo Biuret, formando una coloración violácea debido a la reacción entre sales de cobre y el nitrógeno de la enzima, y posteriormente se midió la absorbancia de cada solución a 540 nm.

Se realizó con anterioridad una curva patrón con albúmina bovina, que relacionara la concentración de proteína y la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. La curva de calibración para el cálculo de la carga de proteína se muestra en la sección 11.1 del Anexo 1.

Un registro fotográfico de la producción del soporte de quitosano, los procedimientos de patronamiento e inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* se muestra en la Figura 5.1.



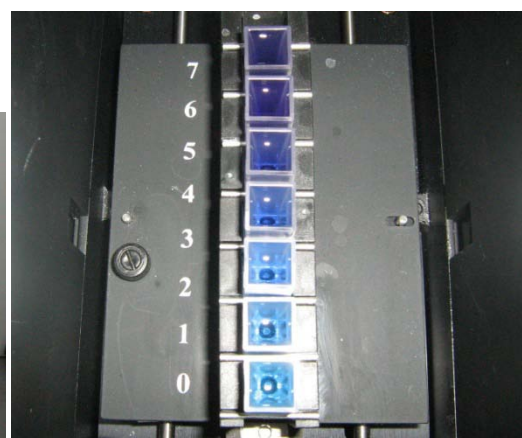
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 5.1 Producción de lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en soporte de quitosano (a) Gel de quitosano en moldes (b) Enzima en solución buffer (c) Lipasa de C.R inmovilizada en quitosano (d) Medida espectrofotométrica de la carga de proteína

5.2 Análisis y resultados

Un extenso análisis de caracterización de los soportes y el sistema enzima-soporte se realizó previamente en varios trabajos de investigadores del Grupo de Investigación en Alimentos-Frutales [71, 74]. En la presente tesis se realizó únicamente la medida de la carga de proteína en los soportes después de la inmovilización cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Eficiencia de carga de proteína en 10 g de soporte de quitosano

	Absorbancia (nm)	Concentración (mg/mL)	Volumen (mL)	Proteína (mg)
Sln inicial	0,106	1,16	500	581,1
Filtrado	0,085	0,94	435	408,7
Lavado 1	0,052	0,59	40	23,6
Lavado 2	0,045	0,51	40	20,6
Proteína en solución madre y de lavados				452,9
Proteína inmovilizada				128,2
Eficiencia de carga de proteína				22,064 %

5.3 Conclusiones

Se inmovilizó exitosamente una lipasa de C.R sobre quitosano utilizando un protocolo desarrollado previamente que usó una técnica de crioestructuración y secado mediante ciclos sucesivos de congelación y descongelación de una dispersión de quitosano entrecruzada débilmente con glutaraldehído.

La eficiencia de carga de proteína ($\approx 22\%$) y la concentración final de proteína en el soporte (1,28%) coincide aproximadamente con los resultados obtenidos en trabajos previos con quitosano y lipasa de *Candida rugosa* en las condiciones de inmovilización utilizadas [71, 74].

6. ESTABILIDAD ENZIMÁTICA EN MEDIO ORGÁNICO

Para el desarrollo de este objetivo se estudió la estabilidad de dos sistemas catalíticos en medios no acuosos de diferente grado de hidrofobicidad, a distintos valores de temperatura, determinando la variación de la actividad enzimática de las lipasas inmovilizadas después de ponerlas en contacto con los medios a cada temperatura durante 24 horas. Para ello se midieron las actividades enzimáticas inicial y final de las lipasas de *Candida rugosa* y de *Mucor miehei*, según un diseño experimental que será mostrado más adelante.

6.1 Materiales y métodos

6.1.1 Reactivos

La lipasa de *Candida rugosa*, la lipasa de *Mucor miehei*, el 4-Nitrofenol y el 4-Nitrofenil Palmitato fueron comprados de Sigma-Aldrich, USA. La acetona y el isooctano grado reactivo fueron obtenidos de Panreac. Todos los demás reactivos empleados fueron grado analítico de casas comerciales reconocidas.

6.1.2 Selección de los solventes

La selección de los solventes se basó en los reportes de la literatura acerca del efecto del coeficiente de partición $\log P$ en la actividad de las lipasas y en su capacidad para disolver la mezcla glicerol-aceite/grasa. No se encontró una opinión uniforme acerca de estos temas. Mientras que la actividad enzimática es más alta con solventes apolares con un alto $\log P$ como es el caso del isooctano ($\log P=5,15$) [75], en el caso particular de la reacción de glicerólisis, además de la polaridad, se deben considerar también los grupos funcionales y las características hidrofílicas e hidrofóbicas de los solventes. Los solventes con bajos $\log P$ como es el caso de la acetona ($\log P=-0,24$) exhiben estas últimas dos características lo cual la hace muy adecuada para volver homogéneas las mezclas glicerol-aceite/grasa. Para la producción de monoglicéridos Damstrup *et al.* (2005) encontraron que para maximizar su rendimiento se deben emplear solventes en el rango de $\log P$ de 0,3-1,5 [67].

Ante esta variedad de resultados se decidió utilizar mezclas de acetona:isooctano que, en diferentes proporciones, permiten modelar solventes con un amplio rango de valores de $\log P_{\text{Mezcla}}$, procedimiento adecuado para procesos de optimización. El isooctano presenta una alta apolaridad y, consecuentemente, un alto $\log P$

mientras que la acetona tiene características hidrofóbicas e hidrofílicas con bajo valor de log P. Igualmente, otro criterio de selección fue que el log P de la mayor parte de las mezclas escogidas de acetona:isooctano se encontrara en el rango óptimo (0,3-1,5) para lograr un alto rendimiento de monoglicéridos [67] como se muestra en la Tabla 6.1. El log P de la mezcla se cálculo según la fórmula hallada en la literatura:

$$\text{Log } P_{\text{Mezcla}} = X_{\text{Acetona}} * \text{Log } P_{\text{Acetona}} + X_{\text{Isooctano}} * \text{Log } P_{\text{Isooctano}}$$

Donde X_i = Fracción molar de cada componente

Tabla 6.1 Log P_{Mezcla} para las mezclas de solventes acetona:isooctano evaluadas

Mezcla Acetona:Isooctano (volumen:volumen)	X_{Acetona}	$X_{\text{Isooctano}}$	Log P_{Mezcla}
0,25:0,75	0,43	0,57	2,85
0,5:0,5	0,69	0,31	1,43
0,75:0,25	0,87	0,13	0,46

6.1.3 Actividad sintética enzimática

Se decidió medir la actividad sintética de las lipasas en un solvente orgánico en lugar de usar el ensayo más convencional de actividad hidrolítica, con el fin de lograr una representación lo más aproximada posible del comportamiento de las lipasas en la reacción de glicerólisis de trioleína en fase no acuosa, objetivo final de este trabajo. Se usó para ello la reacción de transesterificación de para-nitrofenilpalmitato (pNPP) y etanol en heptano. La liberación de para-nitrofenol (pNP) fue detectada por espectrofotometría (410 nm) según adaptación del procedimiento propuesto por Teng y Yu (2007) [65].

El ensayo colorimétrico fue llevado a cabo empleando un sistema de agitación y calentamiento constante. Las lipasas fueron pesadas para obtener 6 mg de proteína en el medio de reacción. Para ello se tuvieron en cuenta los resultados del análisis de nitrógeno por el método Kjeldhal (para la lipasa de *Mucor miehei* con 54,44% de proteína según un análisis hecho por el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales) y el contenido de proteína hallado en la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* sobre quitosano 1,28%, ver sección 5.2). En un ensayo típico a 10 mL de solución 10 mM de pNPP en heptano, se le adicionaron 11,02 mg de lipasa de *Mucor miehei* (o 468,75 mg de lipasa de *Candida rugosa*) que se dejaron acondicionando por 10 minutos a 40°C y 120 rpm. Para iniciar la reacción se agregaron 600 µL de etanol anhidro (99,9%) 1 M en heptano. Este sistema se mantuvo en reacción a

40°C y 120 rpm por 30 minutos, y de él se tomaron cuatro muestras de 100 μ L desde el tiempo 0 cada 10 minutos. A cada muestra se le adicionaron 4 mL de solución acuosa de NaOH 0,1 M. El pNP liberado, que presenta una coloración amarilla en presencia de agua, fue extraído por la fase acuosa alcalina que se llevó al espectrofotómetro para la medición.

Para la determinación de la actividad enzimática usando este método fue necesario construir una curva patrón que relacionara la concentración de pNP y la absorbancia a 410 nm de longitud de onda. Para ello se emplearon soluciones estándar de pNP en heptano a las que se les realizó la extracción con NaOH 1 M acuoso (ver Figura 6.1), tal como se describió anteriormente, para así construir la a curva patrón para la medida de la actividad enzimática que se muestra en la sección 11.2 del Anexo 1.



Figura 6.1 Variación de la coloración amarilla de las muestras según la concentración de pNP liberado en la prueba de actividad

6.1.4 Diseño experimental

La metodología de superficie de respuesta (MSR) fue usada para modelar la estabilidad enzimática de las lipasas de *Mucor miehei* y de *Candida rugosa*, y hallar las condiciones de temperatura y relación de solventes que mejor preserven la actividad sintética de estas enzimas luego de 24 h de exposición a esos ambientes. Con la MSR, se puede probar simultáneamente el efecto de diversas variables con un mínimo de ensayos acorde a arreglos experimentales basados en diseños factoriales. La respuesta y es descrita por una ecuación polinomial como una función de las p variables independientes. Usualmente, esta respuesta es bien modelada por una ecuación polinomial de primer o segundo orden que representa una superficie de dimensión $(p+1)$, que se conoce como la superficie de respuesta. Los parámetros de estas ecuaciones son normalmente desconocidos y, por lo tanto, deben ser estimados a partir de los datos experimentales usando el

principio estadístico de mínimos cuadrados. Además, la diferenciación parcial de las ecuaciones polinomiales es empleada para encontrar el óptimo de la función multivariable. Estas soluciones son llamadas puntos estacionarios [76-78].

Los ensayos fueron llevados a cabo siguiendo un diseño experimental factorial 3^2 de cara centrada con tres réplicas en el punto central como función de la temperatura (T) y la fracción de acetona en la mezcla de solventes (Ac). De esta forma, se realizaron un total de 11 experimentos repartidos de la siguiente forma: cuatro puntos factoriales, con niveles codificados como (+1) y (-1); tres puntos centrales codificados como (0) para evaluar el error puro; y cuatro puntos combinados con el centro. Los valores reales de las variables evaluadas se muestran en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2 Niveles codificados y reales de las variables usadas en el diseño experimental

Niveles Codificados	-1	0	+1
T (°C)	35	40	45
Ac (v)	0,25	0,50	0,75

La matriz de diseño experimental con los valores codificados y valores reales se muestra en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3 Matriz de diseño experimental para la determinación de la estabilidad enzimática

Ensayos	Variables Codificadas		Variables Reales	
	T (°C)	Ac (v) ^a	T (°C)	Ac (v) ^a
1	-1	-1	35	0,25
2	1	-1	45	0,25
3	-1	1	35	0,75
4	1	1	45	0,75
5	0	0	40	0,5
6	0	0	40	0,5
7	0	0	40	0,5
8	-1	0	35	0,5
9	1	0	45	0,5
10	0	-1	40	0,25
11	0	1	40	0,75

^a Fracción de acetona (volumen)

6.2 Análisis y resultados

6.2.1 Ajuste de la actividad de agua inicial (a_w) de las lipasas

Antes de realizar los ensayos de estabilidad enzimática, las lipasas de *Mucor miehei* y de *Candida rugosa* fueron equilibradas a una actividad de agua (a_w) de 0,438 empleando una solución saturada de K_2CO_3 . Se escogió esta actividad de agua relativamente baja para evitar que se produjera la reacción de hidrólisis en paralelo a la de transesterificación en el ensayo de actividad enzimática.

6.2.2 Actividad sintética inicial de las lipasas evaluadas

De acuerdo con el procedimiento descrito para evaluar la actividad sintética (Sección 6.1.3) se calculó la actividad inicial de las lipasas de *Candida rugosa* y de *Mucor miehei* antes de ser sometidas al contacto con los solventes. Los resultados se observan en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4 Actividad sintética inicial de las lipasas medida a partir de la transesterificación de pNPP.

Enzima	Act. Sintética Inicial ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{PROT}}^{-1}$)
Lipasa de <i>Candida rugosa</i> inmovilizada en quitosano	16,43 \pm 0,27
Lipasa de <i>Mucor miehei</i>	35,96 \pm 0,63

Los valores son la media \pm desviación estándar de tres experimentos.

6.2.3 Retención de actividad enzimática en medio orgánico

Siguiendo el diseño experimental (Sección 6.1.4) se realizaron las pruebas para encontrar la actividad enzimática de cada una de las lipasas después de 24 horas de permanecer en contacto con los solventes a determinada temperatura. El porcentaje de retención de actividad sintética (R.A) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Retención Actividad} = (\text{Act. Final} / \text{Act. Inicial}) \times 100$$

Los resultados de las actividades sintéticas finales y de los porcentajes de retención de actividad para las lipasas tratadas en los rangos evaluados se muestran en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5 Resultados obtenidos en el diseño experimental para la evaluación la estabilidad enzimática en medio orgánico de las lipasas evaluadas

Ensayos	Variables Reales		Act. Sintética Final ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{prot}}^{-1}$)		Retención Actividad (%)	
	T (°C)	Ac (v) ^a	M.M ^b	C.R ^c	M.M ^b	C.R ^c
1	35	0,25	17,01	9,05	47,28	55,06
2	45	0,25	28,17	7,64	78,33	46,52
3	35	0,75	32,69	4,34	91,06	26,40
4	45	0,75	16,35	3,80	45,54	23,11
5	40	0,5	28,36	5,29	78,99	32,26
6	40	0,5	28,55	5,23	79,53	31,89
7	40	0,5	28,13	5,27	78,36	32,13
8	35	0,5	26,38	5,47	73,36	33,35
9	45	0,5	20,09	3,96	55,85	24,15
10	40	0,25	28,47	9,26	79,16	56,46
11	40	0,75	28,52	3,96	79,29	24,15

^a Fracción de acetona (volumen)

^b Lipasa de *Mucor miehei*

^c Lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en quitosano

Para la lipasa de *Mucor miehei*, los valores de actividad sintética estuvieron entre 16,35 (R.A=45,54%) y 32,69 (R.A=91,06%) $\mu\text{mol/min} \cdot \text{g}_{\text{prot}}$ mientras que en el caso de la lipasa de *Candida rugosa*, los valores estuvieron entre 3,80 (R.A=23,11%) y 9,26 (R.A=56,46%) $\mu\text{mol/min} \cdot \text{g}_{\text{prot}}$. En una primera aproximación se observa que la lipasa inmovilizada en quitosano redujo más su actividad sintética y, por consiguiente, parece ser menos resistente al ambiente no acuoso en el rango de temperaturas estudiadas.

6.2.4 Ajuste de los modelos y análisis de varianza (ANOVA)

Los datos de porcentaje de retención de actividad de la Tabla 6.4. fueron procesados mediante el software Design-Expert 8.0, con un programa de análisis de varianza ANOVA para obtener la interacción entre las variables de proceso y la respuesta R.A). La significancia estadística del modelo y de cada término, y el error de falta de ajuste, con base en un análisis de regresión con un intervalo de confianza del 95%, fueron hallados y sus valores se muestran en la Tabla 6.6. Un modelo cuadrático (sugerido por el software) fue usado para ajustar los datos resultantes mediante análisis de mínimos cuadrados. La calidad del ajuste del modelo polinomial fue expresada por el coeficiente de determinación R^2 . Los modelos empíricos obtenidos para cada una de las variables de respuesta evaluadas se presentan en la Tabla 6.7.

Tabla 6.6 Resultados del análisis de varianza para cada modelo de estabilidad enzimática empleando Design-Expert 8.0

Lipasa	Términos	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrada	F-Valores	Probabilidad
<i>Mucor miehei</i>	Modelo	2179,15	5	435,83	47,56	0,0003
	T	170,49	1	170,49	18,61	0,0076
	Ac	20,61	1	2,25	20,61	0,1940
	T(Ac)	1465,46	1	1465,46	159,93	<0,0001
	T ²	496,26	1	496,26	54,16	0,0007
	(Ac) ²	0,99	1	0,99	0,11	0,7558
	Falta de Ajuste	45,13	3	15,04	43,90	0,0224
	Error Puro	0,69	2	0,34		
<i>Candida rugosa</i>	Modelo	1451,61	5	290,32	81,00	<0,0001
	T	73,76	1	73,76	20,58	0,0062
	Ac	1186,95	1	1186,95	331,14	<0,0001
	T(Ac)	6,87	1	6,87	1,92	0,2247
	T ²	23,93	1	23,93	6,68	0,0492
	(Ac) ²	182,23	1	182,23	50,84	0,0008
	Falta de Ajuste	17,59	3	5,86	35,59	0,0275
	Error Puro	0,33	2	0,16		

Tabla 6.7 Modelos empíricos para las variables de respuesta en función de la temperatura (T) y la fracción de acetona en la mezcla de solventes (Ac)

Respuestas	Ecuaciones del modelo	R ²	R ² _{adj}
<i>Retención de Actividad M.M (%)</i>	$R.A_{M.M} = -1081,75 + 51,38T + 609,92Ac - 15,31T(Ac) - 0,56T^2 + 9,99(Ac)^2$	0,98	0,96
<i>Retención de Actividad C.R (%)</i>	$R.A_{C.R} = -53,44 + 8,61T - 233,91Ac + 1,05T(Ac) - 0,13T^2 + 135,70(Ac)^2$	0,99	0,97

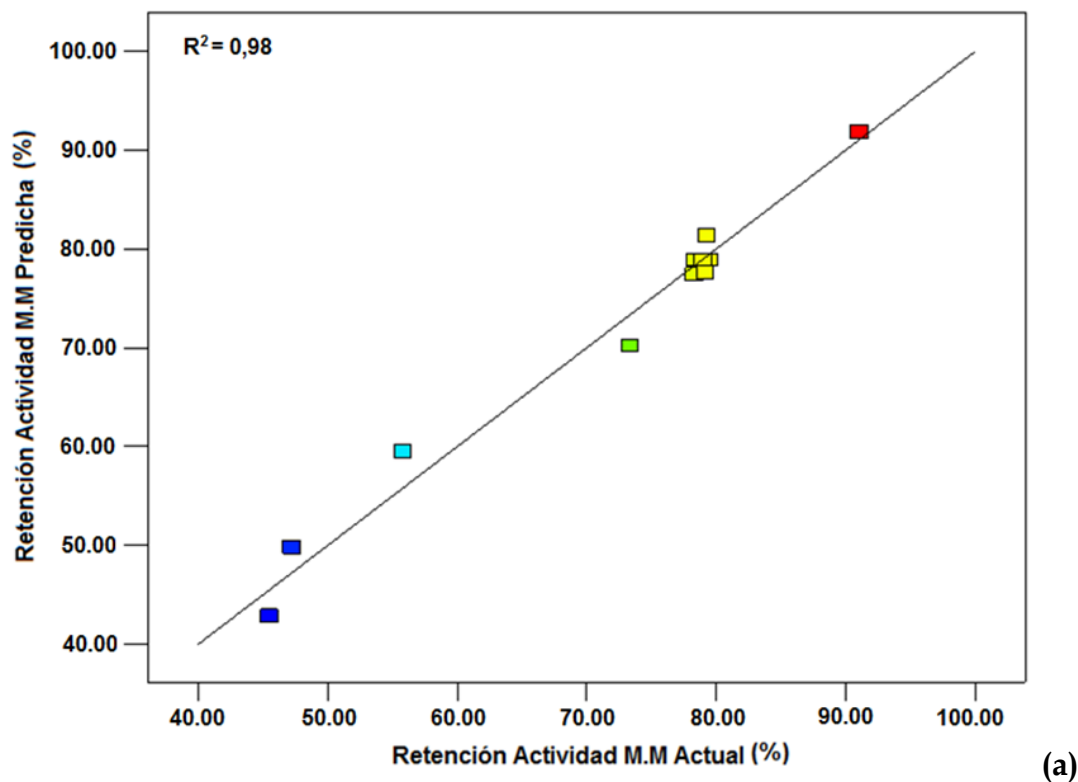
Resaltados en gris se señalan los términos no significativos

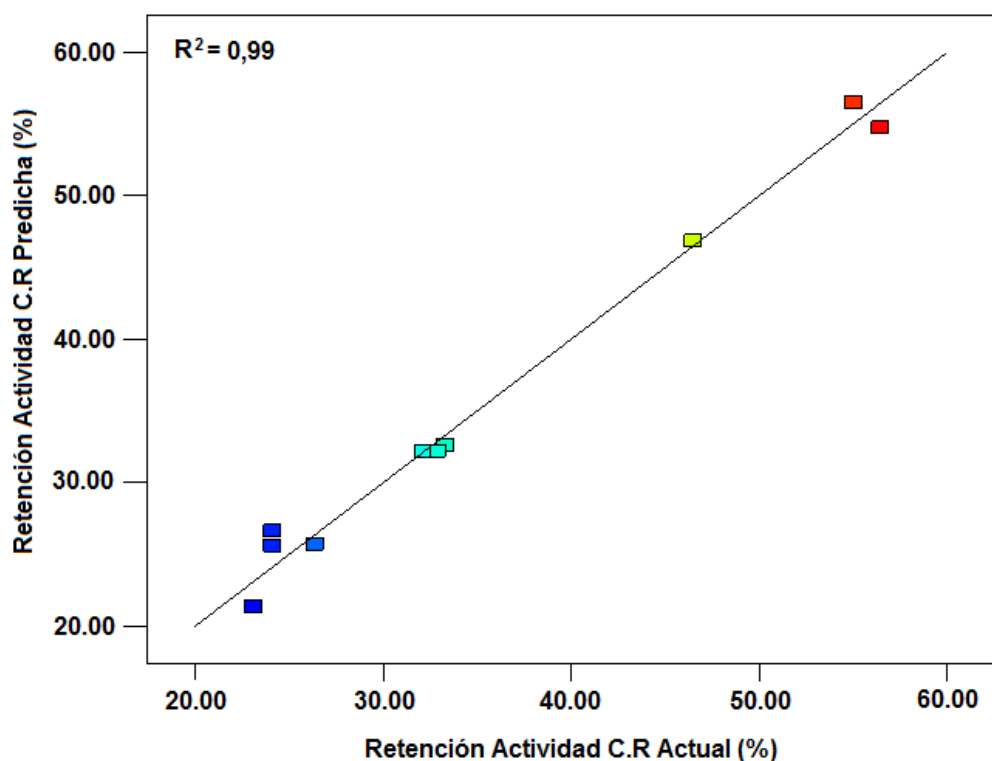
Para el caso de la lipasa de *Mucor miehei*, el F-valor del modelo de 47,56 y la probabilidad de 0,0003 implica que el modelo es significativo, lo que indica que la ecuación del modelo describe adecuadamente la superficie de respuesta de

porcentaje retención de actividad en el intervalo de investigación. Los valores de probabilidad $<0,05$ indican que los términos del modelo son significantes, por lo tanto para este caso los términos que tienen mayor efecto en la variable de respuesta son T , $T(Ac)$ y T^2 , siendo la interacción entre la temperatura y la fracción de acetona (probabilidad $<0,0001$) el término que más influyó la estabilidad enzimática de la lipasa de *Mucor miehei*.

El modelo para la lipasa de *Candida rugosa*, con un F-valor de 81,00 y una probabilidad $<0,0001$ también fue significativo representando que los datos experimentales de porcentaje retención de actividad se ajustaron adecuadamente a los datos predichos por la ecuación del modelo. Los términos que tuvieron una mayor incidencia en la variable de respuesta son T , Ac , T^2 y Ac^2 , siendo la fracción de acetona en la mezcla de solventes (probabilidad $<0,0001$) el término que más influyó en la estabilidad enzimática de la lipasa de *Candida rugosa*.

En la Figuras 6.2a y 6.2b se muestran los porcentajes de retención de actividad experimentales contra los encontrados por los modelos empíricos para cada una de las lipasas evaluadas. Las figuras prueban que los datos de la respuesta predichos por el modelo empírico están de acuerdo con los experimentales en el rango de variables evaluado. Los altos valores de ajuste de datos, $R^2=0,98$ y $R^2=0,99$, para las lipasas de *Mucor miehei* y de *Candida rugosa* respectivamente, indican que el modelo se adecuó bien a los datos observados.





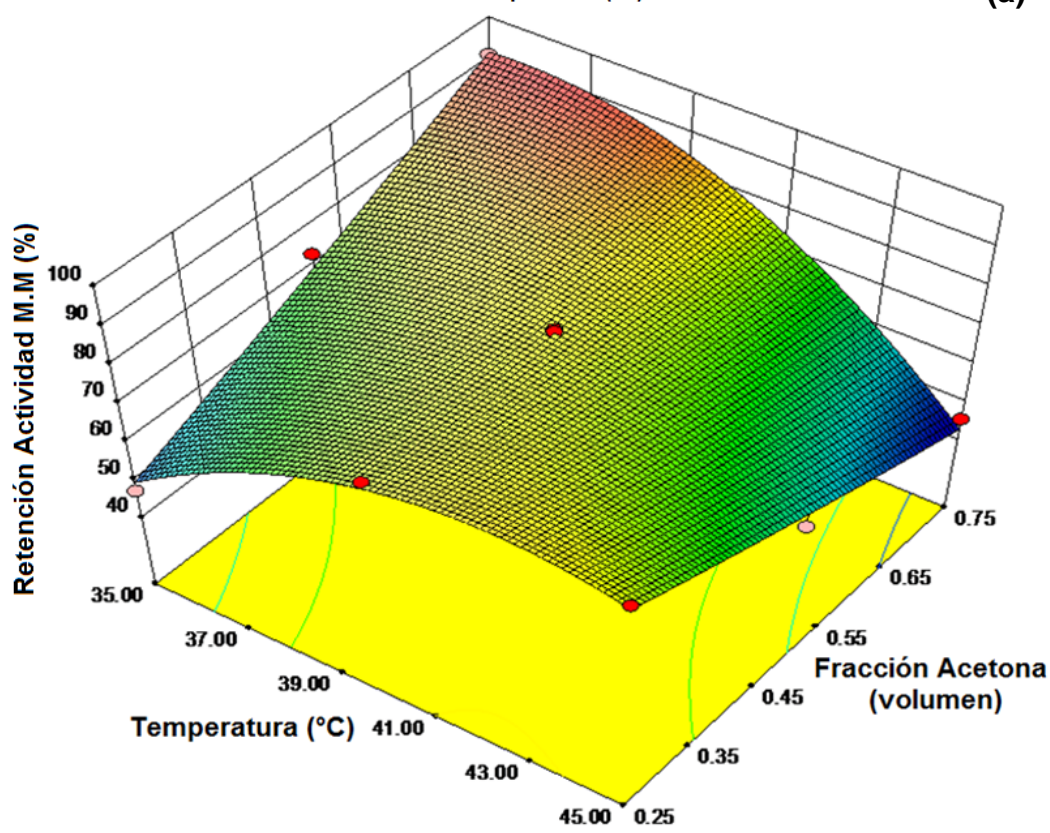
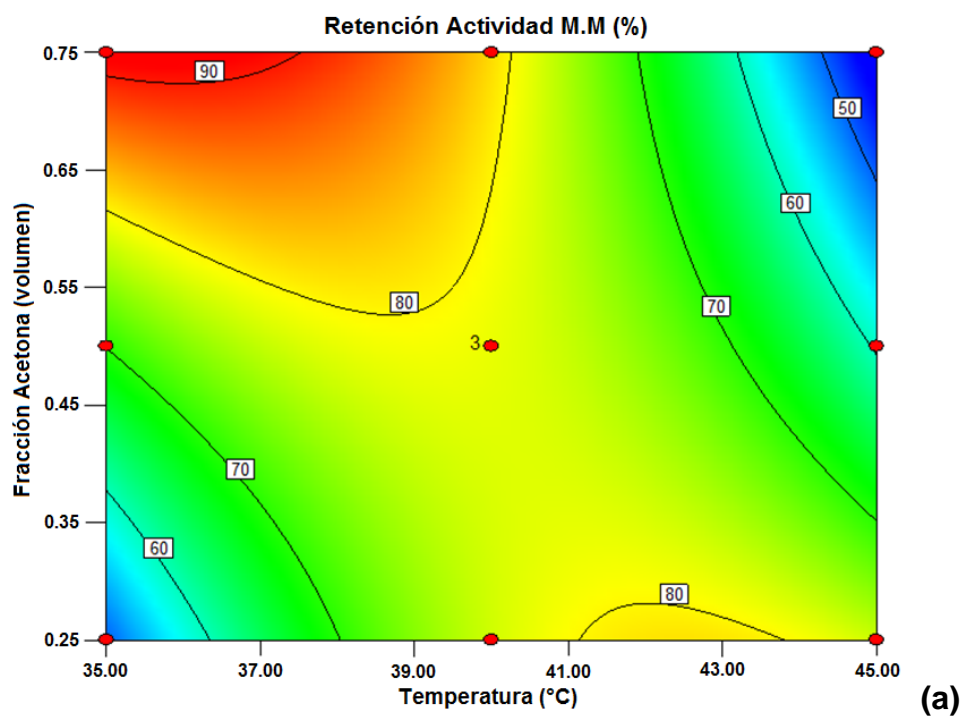
(b)

Figura 6.2 Datos de porcentaje de retención de actividad experimentales contra datos predichos por el modelo para las lipasas (a) *Mucor miehei* (b) *Candida rugosa*

Las condiciones de operación que maximizan la respuesta en el rango evaluado fueron encontradas igualando las derivadas parciales de las ecuaciones del modelo (Tabla 6.7) a cero con respecto a las correspondientes variables.

6.2.5 Efecto de los parámetros en la retención de actividad de las lipasas de *Mucor miehei* y de *Candida rugosa*

En las Figuras 6.3a y 6.3b se muestran, respectivamente, la gráfica de contorno y la superficie de respuesta, para la lipasa de *Mucor miehei*. Se observa que las condiciones que optimizaron la respuesta de porcentaje de retención de actividad ($\approx 91\%$) fueron la temperatura más baja evaluada (35°C) y la mayor fracción de acetona en la mezcla de solventes (0,75). En las Figuras 6.4a y 6.4b se muestran, respectivamente, la gráfica de contorno y la superficie de respuesta, para la lipasa de *Candida rugosa*. Se observa que las condiciones que optimizaron la respuesta de porcentaje de retención de actividad ($\approx 56\%$) fueron temperatura $36,24^{\circ}\text{C}$ y fracción de acetona en la mezcla de solventes 0,25.



(b)
 Figura 6.3 Resultados gráficos del análisis de los datos experimentales de R.A. de la lipasa de *Mucor miehei* (a) Gráfica de Contorno (b) Superficie de Respuesta

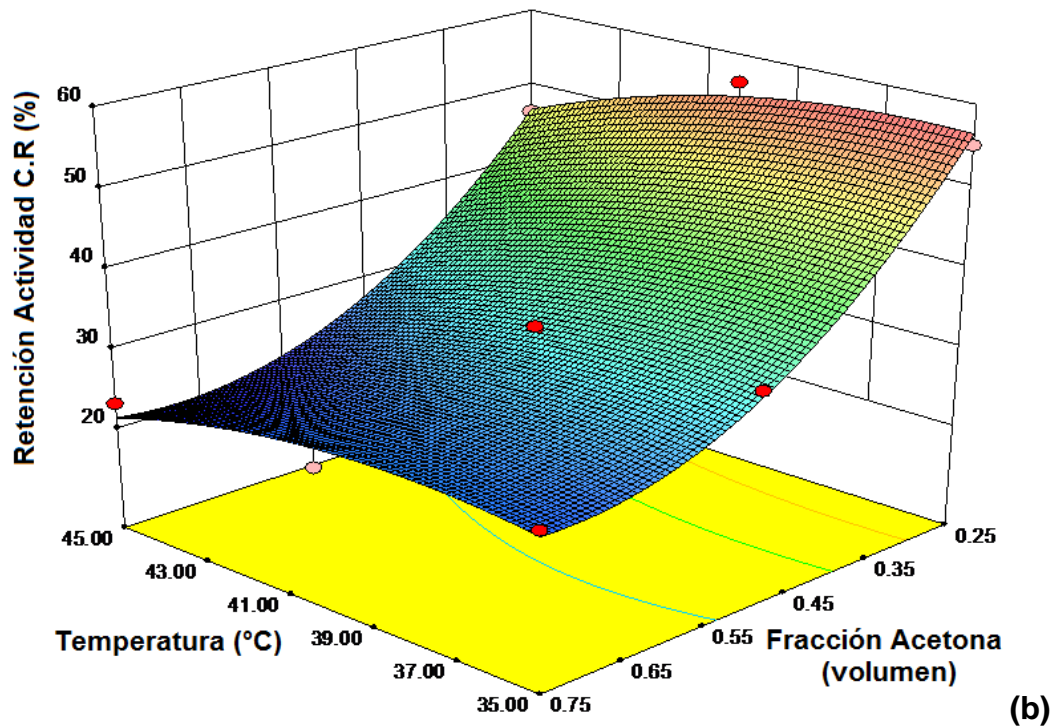
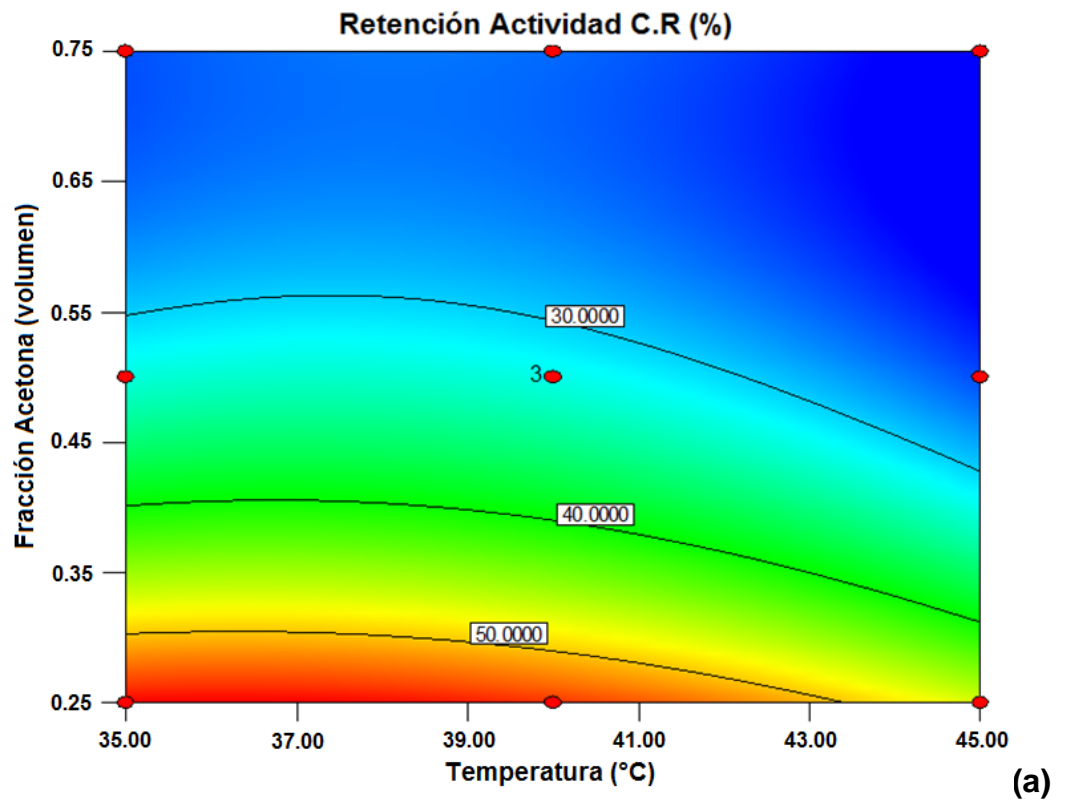


Figura 6.4 Resultados gráficos del análisis de los datos experimentales de la lipasa de *Candida rugosa* (a) Gráfica de Contorno (b) Superficie de Respuesta

En catálisis enzimática en medios no acuosos la actividad catalítica y la estabilidad está correlacionada directamente con la hidrofobicidad de los solventes (altos valores de log P) pues aquellos medios no polares e inmiscibles en agua frecuentemente son más benéficos para la actividad de la enzima. Este hecho se ha explicado porque tales solventes, contrariamente a los polares e hidrofílicos, no despojan a la enzima de la hidratación necesaria para mantenerla en su estado activo [79]. También está reportado que la adición de pequeñas cantidades de solventes hidrofílicos como la acetona mejora la actividad catalítica y la estabilidad enzimática en fase no acuosa. Sin embargo, cuando la concentración de acetona se incrementa, este solvente tiene un efecto inhibitorio sobre el biocatalizador lo que se ha explicado por cambios en la afinidad de la enzima por el sustrato [80].

La lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en quitosano presentó este comportamiento pues el efecto de la fracción de acetona en el medio de reacción fue muy marcado afectando de manera importante la retención de actividad catalítica de la enzima que se redujo 23,11% para la fracción de acetona de 0,75 y mostró un máximo de retención de actividad de 56,46% para la fracción de acetona de 0,25. Para la lipasa de *Candida rugosa*, las dos variables evaluadas la temperatura y la concentración de solventes resultaron significantes, sin embargo la concentración de solventes tuvo un mayor efecto en la respuesta que la temperatura debido a su bajo valor de probabilidad ($<0,0001$) según el modelo empleado. El intervalo que mostró una mejor respuesta de retención de actividad catalítica fue 35-40°C. Este comportamiento concuerda con lo reportado en otro trabajo que utilizó la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en quitosano, donde se verificó que a temperaturas menores de 40°C, la enzima logra retener su actividad hasta en un 80% después de 12 horas, y se demostró que la inmovilización de la lipasa mejora la estabilidad térmica con respecto a la lipasa libre [81].

Un comportamiento totalmente diferente muestran los resultados de las pruebas de estabilidad a solventes y temperatura para la lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada en resina macroporosa de intercambio iónico de tipo fenólico. En este caso, la combinación de mezcla de solventes-temperatura que resultó más adecuada para la actividad de la enzima fue la de baja temperatura (35°C) y alta concentración de acetona (0,75) -con bajo log P- que proporcionó el resultado más alto de las medidas de retención de actividad enzimática (91%). Otra zona de buena estabilización (RA 80% aprox.), se observó entre 42-43 °C y mínima concentración de acetona (0,25). Conviene aclarar que si bien la correlación alta retención de actividad/alto logP del medio no acuoso se presenta en buena parte de las reacciones catalizadas por enzimas, existen múltiples ejemplos de reacciones enzimáticas para los cuales no se cumple tal hipótesis. Así, por ejemplo, en un estudio de la glicerólisis de ácido esteárico catalizada por lipasa de *Candida antártica*, en donde se probaron diferentes solventes polares, apróticos y apolares, se halló que con la acetona como medio se presentó la más alta producción de monoglicéridos [68].

Los efectos de los solventes orgánicos sobre una enzima son principalmente debidos a las interacciones con la capa de agua esencial de la enzima más que con la propia proteína (principalmente con la monocapa de agua sobre la superficie) [82]. En el caso de enzimas inmovilizadas en matrices hidrofóbicas las moléculas de agua requeridas para que la enzima haga su función catalítica no son “disputadas” por el soporte y una mínima actividad de agua en la superficie del mismo es suficiente para que la catálisis proceda. Este argumento se refuerza si se tiene en cuenta que se ha detectado que la lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada en resina de intercambio iónico de tipo fenólico (similar al de este trabajo), pierde toda su actividad después del primer uso, por la acumulación de agua en el soporte formada durante una reacción de esterificación [83], lo que fue atribuido a que en el caso de matrices hidrofóbicas la poca retención de agua en su superficie hace que se reduzca el riesgo de desnaturalización [84-85] y, contrariamente, el exceso de agua que rechaza el soporte y rodea la enzima puede favorecer su desnaturalización siendo entonces conveniente emplear un solvente ligeramente polar para que la elimine y así lograr conservarla en su estado activo. Adicionalmente, existen investigaciones que demuestran que, a diferencia de otros solventes polares como metanol y etanol, la acetona resulta ser benéfica en algunos casos para conservar la actividad enzimática [86].

Con este mismo razonamiento se puede explicar el porqué del comportamiento contrario del otro sistema catalítico analizado. El quitosano, a diferencia de la resina fenólica, es altamente hidrofílico. La presencia de un solvente también hidrofílico como la acetona, en el microambiente que rodea la enzima de *Candida rugosa* inmovilizada en este biopolímero, hace que en esta situación la competencia por el agua de enzima, soporte y solvente haga que la disponibilidad neta de agua para la enzima sea muy baja en las mezclas ricas en acetona y superior en las mezclas de medios no acuosos mas concentradas en iso-octano.

6.3 Conclusiones

Con el fin de seleccionar el sistema catalítico, el medio orgánico y la temperatura más apropiados para la producción de monoglicéridos, se hicieron pruebas para hallar el efecto de la exposición tres diferentes sistemas de solventes orgánicos a distintas temperaturas durante 24 horas, sobre la retención de actividad (R.A) de dos lipasas inmovilizadas: *Candida rugosa* en quitosano (C.R) y *Mucor miehei* en resina macroporosa de intercambio iónico (M.M).

El biocatalizador M.M presentó la mayor R.A en casi todas las pruebas incluidas en el diseño experimental. En las condiciones del ensayo No.3, que corresponden a 35°C y 0,75 de fracción volumétrica de acetona, el sistema M.M presentó el máximo de R.A. El modelo generado por el análisis MSR mediante el software Design Expert 8.0 predijo que efectivamente se espera la mayor retención de

actividad (~90%) alrededor de este punto experimental. Dicho modelo se ajustó adecuadamente a los resultados de los ensayos en todo el rango de estudio de los factores, lo que se demuestra con su alto factor de correlación ($R^2=0,98$).

El sistema catalítico de la lipasa de C.R se afectó sensiblemente en su respuesta catalítica luego de las 24 horas de las pruebas presentando como valor máximo de retención de actividad de 56,46%, a las condiciones de 36,24°C y 0,25 de fracción volumétrica de acetona en el sistema. El modelo predicho por el software Design Expert 8.0 para el análisis de los datos, se ajustó adecuadamente a los valores experimentales en el rango evaluado, lo que se comprueba con el alto factor de correlación ($R^2=0,99$).

7. GLICERÓLISIS DE TRIOLEÍNA

Después de comparar el comportamiento de las lipasas bajo el criterio de la estabilidad enzimática en los solventes orgánicos, y de acuerdo con los mejores resultados de estabilidad según el análisis realizado en el capítulo 6, se eligió la lipasa de *Mucor miehei* para estudiar su comportamiento como catalizador en la glicerólisis de trioleína en acetona:isooctano 0,75:0,25 (v:v), a 35°C con el objetivo de encontrar los rangos o valores de las variables de reacción que maximizaran la producción de monoglicéridos.

La elección de la temperatura y concentración de los solventes que se emplearon en la reacción de glicerólisis, se realizó teniendo en cuenta, que la lipasa de *Mucor miehei* presentó dos regiones de alta retención de actividad (ver Figura 6.3), una a baja temperatura y alta fracción de acetona ($\approx 90\%$) y otra a alta temperatura y baja fracción de acetona ($\approx 80\%$). Pensando en el posible escalamiento de la reacción a planta piloto o incluso industria, resulta más conveniente emplear una mezcla de solventes con una mayor fracción de acetona (0,75), ya que este solvente es menos costoso en comparación con el isooctano, y adicionalmente, debido a que tiene una temperatura de ebullición más baja ($T_{Ac}^{Ebu}=56,2^{\circ}C$ y $T_{Iso}^{Ebu}=99,1^{\circ}C$) la remoción de los productos al final del proceso es más simple reduciendo los costos de separación. La temperatura más baja (35°C) también favorece el proceso a mayor escala ya que reduce el gasto energético que llega a ser una parte apreciable de los costos totales de una operación de producción.

7.1 Materiales y métodos

7.1.1 Reactivos

La lipasa de *Mucor miehei* y la trioleína (>65%) fueron comprados de Sigma-Aldrich, USA. La glicerina USP fue obtenida de la industria Jabonerías Hada S.A. Los patrones cromatográficos, trioleína, monoleína, dioleína y ácido oleico (>99%) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, USA. La acetona y el isooctano grado reactivo fueron comprados de Panreac. Los reactivos grado HPLC, hexano, isopropanol y acetonitrilo fueron obtenidos de Merck. Todos los demás reactivos empleados fueron grado analítico de casas comerciales reconocidas.

7.1.2 Procedimiento para fijar la actividad de agua (a_w)

Se ajustó la actividad de agua (a_w) de la lipasa ubicando el material en cámaras de humedad controlada por el tiempo suficiente hasta que alcanzara el equilibrio con el ambiente (hasta que su peso no cambió). Este método, que se usa además para hallar las isotermas de sorción de una muestra, se denomina método gravimétrico estático. Los detalles de cómo se realiza este procedimiento se hallan en la literatura [87-88]. Algunas de las sales que se usaron para este propósito, con su respectiva actividad de agua en equilibrio a 25°C están relacionadas en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1 Actividades de agua (a_w) sobre soluciones acuosas saturadas de algunas sales a 25°C [87]

Solución saturada de sal	Actividad de agua a_w
LiCl	0,115
MgCl ₂	0,3273
K ₂ CO ₃	0,438
NaCl	0,7532
KCl	0,8432
BaCl ₂	0,9026

La lipasa se colocó en un recipiente hermético en el que, en su parte inferior y sin entrar en contacto directo con ella, se encontraba la solución saturada de sal. Luego de un tiempo prudencial (aproximadamente 15 días), cuando el material no mostró variación de peso, se consideró que había adquirido la actividad de agua correspondiente a la humedad controlada por la solución salina. Las lipasas, de actividad de agua inicial así controlada, se utilizaron en la reacción de glicerólisis de trioleína.

7.1.3 Condiciones de reacción

La lipasa de *Mucor miehei* fue adicionada al sistema constituido por trioleína 0,2 M en el solvente orgánico acetona:isooctano (0,75:0,25, v:v) y se dejó acondicionando por 1 hora a 35°C y 200 rpm en un baño termostado Thermo Electron Corporation, modelo 2870 (USA). La reacción se inició adicionando glicerina; se tomaron muestras cada seis horas por 24 horas. El volumen total de reacción fue de 25 mL.

Las condiciones de reacción fijas para la glicerólisis fueron:

- ♦ Temperatura: 35°C

- ◆ Concentración de acetona: isooctano: 0,75:0,25 (v:v)
- ◆ Velocidad de agitación: 200 rpm
- ◆ Volumen de reacción: 25 mL
- ◆ Concentración de trioleína en el medio de reacción: 0,2 M

Con estos parámetros fijos se estudió el comportamiento de la glicerólisis de trioleína durante 24 h. La actividad de agua inicial (a_w) de la lipasa, la cantidad de proteína (Prot) presente y la relación molar (Gli/Trio) fueron variadas de acuerdo con el diseño experimental que combina el efecto de las siguientes variables:

- ◆ Relación molar Glicerina/Trioleína
- ◆ Actividad de agua (a_w) inicial de la lipasa
- ◆ Cantidad de proteína en el medio de reacción

En el período de avance de la reacción declarado (24h) se monitorearon las concentraciones de ácidos grasos libres, mono, di y trioleína presentes cada seis h.

7.1.4 Diseño experimental

La metodología de superficie de respuesta (MRS) también fue usada para modelar la reacción de glicerólisis y optimizar las condiciones de reacción. Para explorar el efecto de las variables sobre la respuesta en la región de investigación, se empleó un diseño compuesto central rotatorio con tres variables en cinco niveles, como función de la relación molar glicerina/trioleína (Gli/Trio), la actividad de agua inicial (a_w) de la lipasa de *Mucor miehei* y la cantidad de proteína en el medio de reacción (Prot).

El número total de experimentos con tres variables fue de $17=2^k+2k+3$, donde k es el número de variables independientes. Los experimentos estuvieron repartidos de la siguiente forma: ocho puntos factoriales, con niveles codificados como (+1) y (-1); seis puntos axiales, con niveles codificados como ($+\sqrt{3}$) y ($-\sqrt{3}$); y tres puntos centrales codificados como (0) para evaluar el error puro. Los valores reales de variables evaluados se muestran en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2 Niveles codificados y reales usados en el diseño experimental

Niveles Codificados	$-\sqrt{3}$	-1	0	+1	$+\sqrt{3}$
Gli/Trio	1	1,8	3	4,2	5
a_w	0,112	0,270	0,502	0,735	0,893
Prot (mg)	30	54,29	90	125,71	150

La matriz de diseño experimental con los valores codificados y valores reales se muestra en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3 Matriz de diseño experimental para la reacción de glicerólisis

Ensayos	Variables Codificadas			Variables Reales		
	Gli/Trio	a _w	Prot (mg)	Gli/Trio	a _w	Prot (mg)
1	-1	1	1	1,8	0,735	125,71
2	-1	-1	1	1,8	0,270	125,71
3	-1	-1	-1	1,8	0,270	54,29
4	-1	1	-1	1,8	0,735	54,29
5	1	-1	-1	4,2	0,270	54,29
6	1	1	-1	4,2	0,735	54,29
7	1	1	1	4,2	0,735	125,71
8	1	-1	1	4,2	0,270	125,71
9	0	0	0	3	0,502	90
10	0	0	0	3	0,502	90
11	0	0	0	3	0,502	90
12	0	0	-√3	3	0,502	30
13	0	-√3	0	3	0,112	90
14	-√3	0	0	1	0,502	90
15	√3	0	0	5	0,502	90
16	0	√3	0	3	0,893	90
17	0	0	√3	3	0,502	150

7.1.5 Métodos analíticos

Para el seguimiento de la reacción se empleó espectrofotometría UV-vis para la identificación de los ácidos grasos libres, y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la identificación de los mono-, di- y triglicéridos. En cada ensayo se tomaron muestras de 200 µl cada 6 horas durante 24 horas. Las muestras se llevaron a la estufa a 90°C para evaporar la mezcla de solventes acetona:isooctano que se empleó como medio de reacción. Luego de esto se hicieron las pruebas de medida de la concentración de los productos presentes como se describe a continuación.

Identificación de ácidos grasos libres

Debido a que la reacción se realizó con trioleína, los ácidos grasos libres producidos se consideran constituidos principalmente por ácido oleico. Para su evaluación se empleó un método colorimétrico [89]. Se agregaron a cada muestra 2,5 mL de benceno y 0,5 mL de solución acuosa al 5% (p/v) de acetato cúprico ajustada a pH 6.0-6.2 usando piridina. Este conjunto fue agitado vigorosamente en un vortex a 1600 rpm por 2 minutos. Por último, se realizó la lectura de la absorbancia de la fase superior de coloración azul claro de las muestras a 715 nm

en un espectrofotómetro UV-vis modelo 6405, Jenway con celda de 1 cm de longitud (UK). En la Figura 7.1 se presenta un conjunto de muestras coloreadas de diferente concentración de ácido oleico.

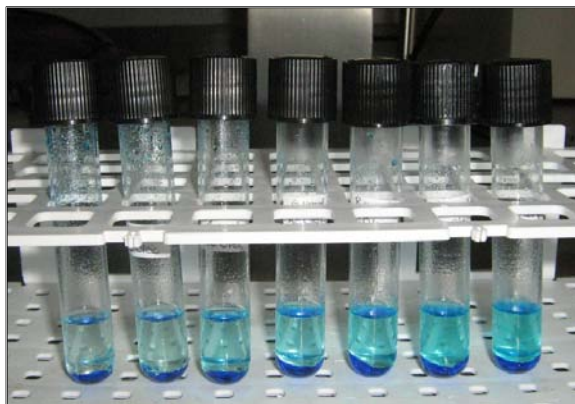


Figura 7.1 Formación de dos fases en la determinación de ácido oleico mediante método colorimétrico

Para la determinación de los ácidos grasos libres se realizó con anterioridad una curva patrón, que relacionara la concentración de ácido oleico con la absorbancia a 715 nm de longitud de onda. Para ello se emplearon muestras de estándar de ácido oleico (99,9%) y se realizó el proceso descrito previamente. La curva patrón para la determinación de ácido oleico se puede observar en la sección 11.3 del Anexo 1.

Identificación de mono-, di- y triglicéridos

Para identificar los mono-, di- y triglicéridos se desarrolló un método de HPLC. Nuevamente, debido a que el sustrato utilizado en la glicerólisis fue trioleína, los mono- y diglicéridos producidos fueron principalmente monoleína y dioleína.

Las muestras a las que se les evaporó el solvente fueron diluidas en 1 mL de hexano, y se analizaron mediante un sistema de HPLC Hitachi modelo Elite LaChrom (Tokio, Japón) equipado con una bomba L-2130, un detector UV L-2400 y una columna analítica LiChroCART C₁₈ de fase reversa (5 µm, 250 x 4,0 mm). La fase móvil, constituida por una mezcla de acetonitrilo:isopropanol:hexano (47:29:24, v:v:v), fue bombeada a 40°C, una velocidad de flujo de 1 mL/min. Las lecturas se hicieron a 215 nm de longitud de onda.

Para la determinación de los mono-, di- y triglicéridos se realizaron previamente curvas de calibración, que relacionaron la concentración de monoleína, dioleína y trioleína con la absorbancia a 215 nm de longitud de onda. Para ello se emplearon muestras de estándar de monoleína, dioleína y trioleína (99,9%) a diferentes concentraciones.

7.2 Análisis y resultados

7.2.1 Seguimiento de la glicerólisis de trioleína

Las reacciones de glicerólisis de trioleína se condujeron de acuerdo con el diseño experimental (Tabla 7.3). Según este diseño se hicieron tres repeticiones del punto central (**Gli/Trio=3** **a_w =0,5** **Prot=90 mg**), cuyos resultados se pueden observar en la Figura 7.2. Allí se muestra la evolución de las concentraciones (% másico) de la monoleína, la dioleína y el ácido oleico producidos, junto con la concentración de la trioleína remanente. La casi perfecta superposición de las tres gráficas indica la reproducibilidad que se logró en estos ensayos. También es oportuno resaltar que en las condiciones del punto central se alcanzó la producción más alta de monoleína entre todas las pruebas realizadas (66,93-68,39%), condición que se alcanzó aproximadamente a las 18 h de reacción.

En contraste, el ensayo 13 (Figura 7.3), que corresponde al valor más bajo de actividad de agua inicial del biocatalizador (a_w =0,11), muestra la evolución de la reacción en las condiciones Gli/Trio=3 y Prot=90 mg. El consumo del sustrato en este caso fue bajo (24,87% en 24h) y, consecuentemente, también las producciones de mono- y dioleína (11,38% y 11,14%, respectivamente). La disponibilidad de agua para la lipasa en tales condiciones de actividad de agua inicial fue insuficiente para conservar su función catalítica.

El ensayo 7 (Figura 7.4) a las condiciones de Gli/Trio=4,2; a_w =0,73 y Prot=125,71 mg, produjo los valores finales superiores de concentración de dioleína y ácido oleico. En este caso se puede concluir que a valores de actividad de agua (a_w) altos se favorece la reacción lateral de hidrólisis y se aumenta la producción de dioleína y ácido oleico.

En el anexo 2 se muestran las gráficas correspondientes a estas mismas mediciones para los demás ensayos del diseño experimental.

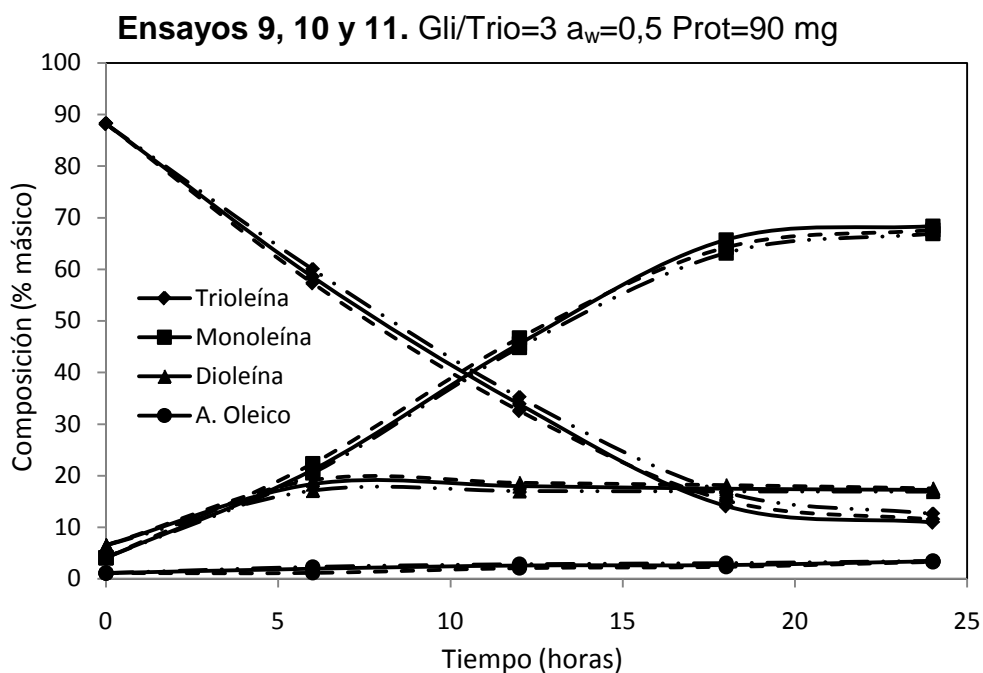


Figura 7.2 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,5$, Gli/Trio=3 y Prot=90 mg donde se presentó la más alta producción de monoleína. Tres repeticiones centrales.

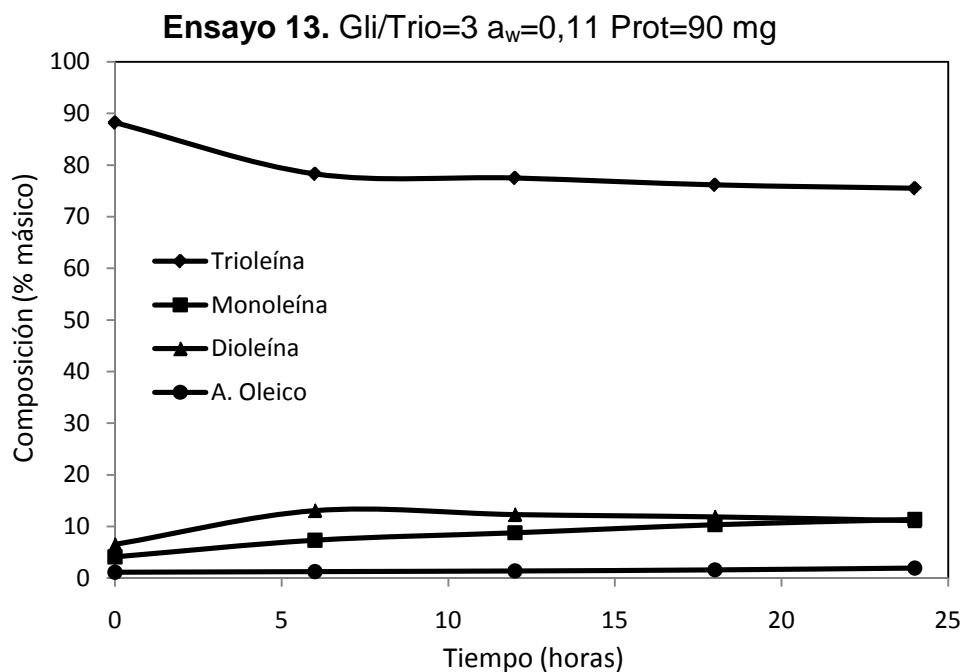


Figura 7.3 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,11$, Gli/Trio=3 y Prot=90 mg donde se presentó la más baja producción de monoleína.

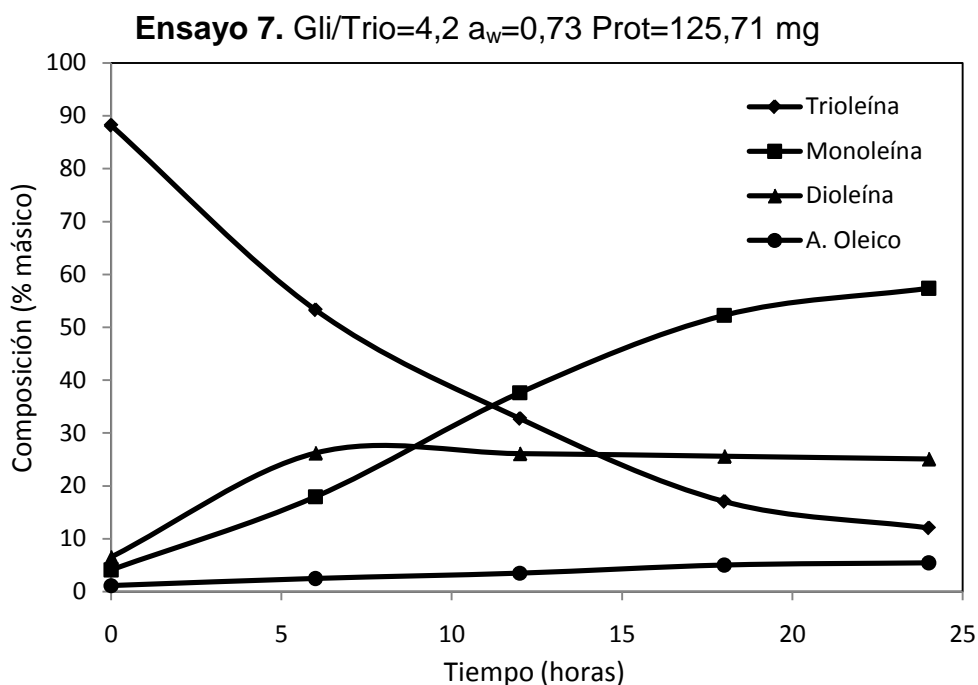


Figura 7.4 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,73$, Gli/Trio=4,2 y Prot=125,71 mg donde se presentaron las mayores producciones de dioleína y ácido oleico.

7.2.2 Ajuste de los modelos y análisis de varianza (ANOVA)

Los datos resultantes de la investigación del efecto de las tres variables, actividad de agua del biocatalizador (a_w), la relación molar glicerina/trioleína (Gli/Trio) y cantidad de proteína en el medio de reacción (Prot) sobre las respuestas: el porcentaje de monoleína (MO), dioleína (DO) y ácido oleico (AO) producidos, y el porcentaje de trioleína (TO) convertido durante la glicerólisis de trioleína después de 24 horas se presentan en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4 Valores de las variables de respuesta de la matriz de diseño experimental como función de Gli/Trio, a_w y Prot.

Ensayos	Variables Reales			% Másico			
	Gli/Trio	a_w	Prot (mg)	TO	MO	DO	AO
1	1,8	0,735	125,71	77,63	55,54	18,62	3,47
2	1,8	0,270	125,71	44,75	35,79	7,17	1,79
3	1,8	0,270	54,29	36,84	25,92	8,81	2,11
4	1,8	0,735	54,29	76,32	59,06	15,23	2,03
5	4,2	0,270	54,29	32,73	15,87	13,29	3,57
6	4,2	0,735	54,29	76,31	53,97	20,17	2,17
7	4,2	0,735	125,71	87,94	57,37	25,12	5,45
8	4,2	0,270	125,71	48,98	30,18	16,15	2,65
9	3	0,502	90	88,48	67,65	17,52	3,31
10	3	0,502	90	89,04	68,39	17,24	3,41
11	3	0,502	90	87,39	66,93	16,94	3,52
12	3	0,502	30	60,57	45,16	12,48	2,93
13	3	0,112	90	24,87	11,38	11,14	2,35
14	1	0,502	90	53,17	43,84	7,98	1,35
15	5	0,502	90	61,14	36,28	22,02	2,84
16	3	0,893	90	78,51	53,75	21,84	2,92
17	3	0,502	150	54,59	34,84	15,16	4,59

Los datos de composición final de las reacciones de glicerólisis de trioleína mostrados en la Tabla 7.4. fueron procesados mediante el software Design-Expert 8.0, con un programa de análisis de varianza ANOVA para obtener la interacción entre las variables de proceso y las respuestas. La significancia estadística del modelo y de cada término, y el error de falta de ajuste, con base en un análisis de regresión con un intervalo de confianza del 95%, se muestran en la Tabla 7.5. Modelos cuadráticos para todas las respuestas analizadas (sugeridos por el software) fueron usados para ajustar los datos resultantes mediante análisis de mínimos cuadrados. La calidad del ajuste del modelo polinomial fue expresada por el coeficiente de determinación R^2 . Los modelos empíricos obtenidos para cada una de las variables de respuesta evaluadas se presentan en la Tabla 7.6.

Tabla 7.5 Resultados del análisis de varianza para cada modelo de composición final de la glicerólisis empleando Design-Expert 8.0

Compo- nente	Términos	Suma de Cuadrados	Grados Libertad	Media Cuadrada	F- Valores	Probabi- lidad
<i>Trioleína</i>	Modelo	6786,25	9	754,03	16,29	0,0007
	a _w	4399,23	1	4399,23	95,06	< 0,0001
	Gli/Trio	41,56	1	41,56	0,90	0,3749
	Prot	53,55	1	53,55	1,16	0,3177
	a _w (Gli/Trio)	12,95	1	12,95	0,28	0,6131
	a _w (Prot)	15,74	1	15,74	0,34	0,5781
	Prot(Gli/Trio)	43,52	1	43,52	0,94	0,3645
	a _w ²	1479,64	1	1479,64	31,97	0,0008
	(Gli/Trio) ²	1022,64	1	1022,64	22,10	0,0022
	Prot ²	990,63	1	990,63	21,41	0,0024
	Falta de Ajuste	322,55	5	64,51	91,63	0,0108
	Error Puro	1,41	2	0,70		
<i>Monoleína</i>	Modelo	4732,75	9	525,86	14,46	0,0010
	a _w	2627,73	1	2627,73	72,26	<0,0001
	Gli/Trio	73,28	1	73,28	2,02	0,1987
	Prot	3,29	1	3,29	0,090	0,7723
	a _w (Gli/Trio)	19,22	1	19,22	0,53	0,4908
	a _w (Prot)	73,81	1	73,81	2,03	0,1973
	Prot(Gli/Trio)	16,13	1	16,13	0,44	0,5267
	a _w ²	1382,82	1	1382,82	38,03	0,0005
	(Gli/Trio) ²	800,27	1	800,27	22,01	0,0022
	Prot ²	804,30	1	804,30	22,12	0,0022
	Falta de Ajuste	253,48	5	50,7	95,13	0,0104
	Error Puro	1,07	2	0,53		
<i>Diroleína</i>	Modelo	409,50	9	45,50	31,72	< 0,0001
	a _w	195,83	1	195,83	136,54	< 0,0001
	Gli/Trio	172,33	1	172,33	120,15	< 0,0001
	Prot	14,49	1	14,49	10,10	0,0155
	a _w (Gli/Trio)	0,51	1	0,51	0,36	0,5697
	a _w (Prot)	6,34	1	6,34	4,42	0,0732
	Prot(Gli/Trio)	4,59	1	4,59	3,20	0,1168
	a _w ²	0,20	1	0,20	0,14	0,7207
	(Gli/Trio) ²	4,90	1	4,90	3,42	0,1069
	Prot ²	13,07	1	13,07	9,11	0,0194
	Falta de Ajuste	10,02	5	2	165,55	0,0060
	Error Puro					

	Ajuste					
	Error Puro	0,024	2	0,012		
Ácido Oleico	Modelo	15,77	9	1,75	12,55	0,0015
	a_w	1,15	1	1,15	8,22	0,0241
	Gli/Trio	3,53	1	3,53	25,31	0,0015
	Prot	2,88	1	2,88	20,64	0,0027
	$a_w(\text{Gli/Trio})$	5×10^{-3}	1	5×10^{-3}	0,036	0,8552
	$a_w(\text{Prot})$	4,44	1	4,44	31,81	0,0008
	$\text{Prot}(\text{Gli/Trio})$	0,19	1	0,19	1,38	0,2790
	a_w^2	0,70	1	0,70	4,98	0,0607
	$(\text{Gli/Trio})^2$	2,18	1	2,18	15,59	0,0055
	Prot^2	0,25	1	0,25	1,80	0,2214
	Falta de Ajuste	0,98	5	0,20	308,11	0,0032
	Error Puro	1.27×10^{-3}	2	6.33×10^{-4}		

Tabla 7.6 Modelos empíricos para las variables de respuesta en función de la actividad de agua (a_w), la relación molar glicerina/trioleína (Gli/Trio) y la cantidad de proteína en el medio de reacción (Prot)

Componentes	Ecuaciones del modelo	R^2	R^2_{adj}
Trioleína Convertida (%)	$TO = -118,92 + 291,71a_w + 33,95(\text{Gli/Trio}) + 1,30(\text{Prot}) + 4,56 a_w(\text{Gli/Trio}) - 0,17a_w(\text{Prot}) + 0,054(\text{Gli/Trio})(\text{Prot}) - 211,94 a_w^2 - 6,61(\text{Gli/Trio})^2 - 7,35 \times 10^{-3}(\text{Prot})^2$	0,95	0,89
Monoleína (%)	$MO = -115,42 + 281,83a_w + 27,40(\text{Gli/Trio}) + 1,29(\text{Prot}) + 5,55a_w(\text{Gli/Trio}) - 0,37a_w(\text{Prot}) + 0,033(\text{Gli/Trio})(\text{Prot}) - 204,88a_w^2 - 5,85(\text{Gli/Trio})^2 - 6,62 \times 10^{-3}(\text{Prot})^2$	0,95	0,88
Dioléína (%)	$DO = -5,78 + 11,82a_w + 4,57(\text{Gli/Trio}) + 0,074(\text{Prot}) - 0,91 a_w(\text{Gli/Trio}) + 0,11 a_w(\text{Prot}) + 0,018(\text{Gli/Trio})(\text{Prot}) - 2,46 a_w^2 - 0,46(\text{Gli/Trio})^2 - 8,44 \times 10^{-4}(\text{Prot})^2$	0,98	0,94
A. Oleico (%)	$AO = 2,29 - 1,94a_w + 1,97(\text{Gli/Trio}) - 0,064(\text{Prot}) - 0,089a_w(\text{Gli/Trio}) + 0,089a_w(\text{Prot}) + 3,62 \times 10^{-3}(\text{Gli/Trio})(\text{Prot}) - 4,59a_w^2 - 0,31(\text{Gli/Trio})^2 + 1,17 \times 10^{-4}(\text{Prot})^2$	0,94	0,87

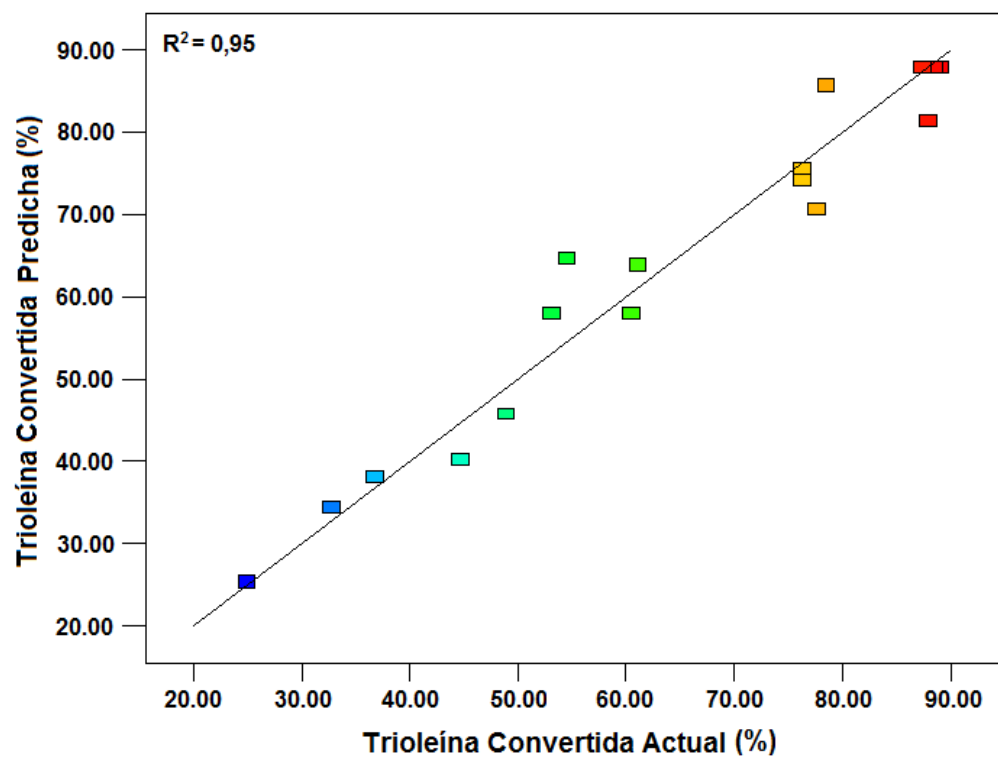
Resaltados en gris los términos no significativos

El modelo del porcentaje de trioleína convertida, fue significativo con un F-valor de 16,29 y una probabilidad de 0,0007, lo que implica que el modelo cuadrático se ajustó adecuadamente a los datos experimentales en el rango evaluado. En el caso del porcentaje de monoleína producida en la reacción, el modelo cuadrático fue significativo con un F-valor de 14,46 y una probabilidad de 0,0010, implicando una buena representación de los datos observados por el modelo propuesto. Para ambos modelos, los términos que resultaron significativos fueron a_w , a_w^2 , $(Gli/Trio)^2$ y $Prot^2$, siendo la actividad de agua (a_w) la variable que más afectó tanto la conversión de trioleína como la producción de monoleína al final de la reacción, demostrado por su pequeño valor de probabilidad ($<0,0001$).

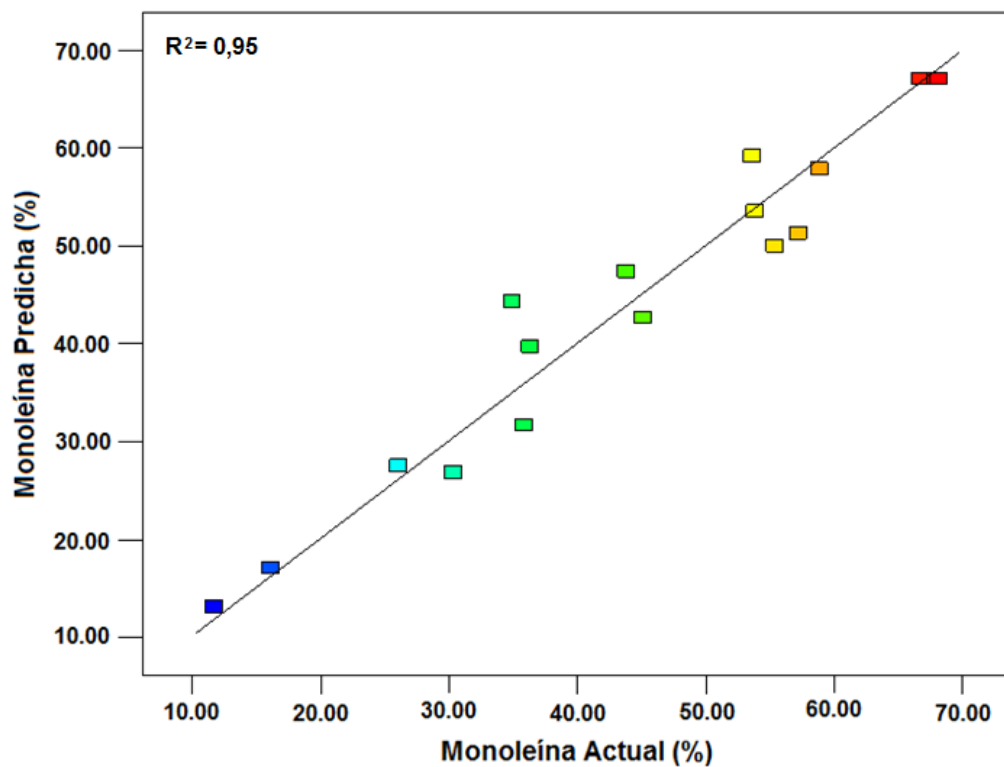
Por otro lado, el modelo lineal para la producción de dioléína con un F-valor de 31,72 y una probabilidad $<0,0001$ resultó significativo. En este caso los términos a_w , Gli/Trio, Prot y $Prot^2$ fueron significativos para la respuesta, sin embargo la actividad de agua (a_w) y la relación molar (Gli/Trio) tuvieron un efecto mayor, ya que su valor de probabilidad fue más pequeño ($<0,0001$).

Adicionalmente, el modelo cuadrático que representa la producción de ácido oleico, obtuvo un F-valor igual a 12,55 y una probabilidad de 0,0015 por lo cual resultó significativo. Los términos que más afectaron la respuesta fueron a_w , Gli/Trio, Prot, $a_w(Prot)$ y $(Gli/Trio)^2$, sin embargo la interacción entre la actividad de agua y la cantidad de proteína $a_w(Prot)$ fue la variable que más influenció la producción de ácido oleico, ya que presentó el valor de probabilidad más bajo (0,0008).

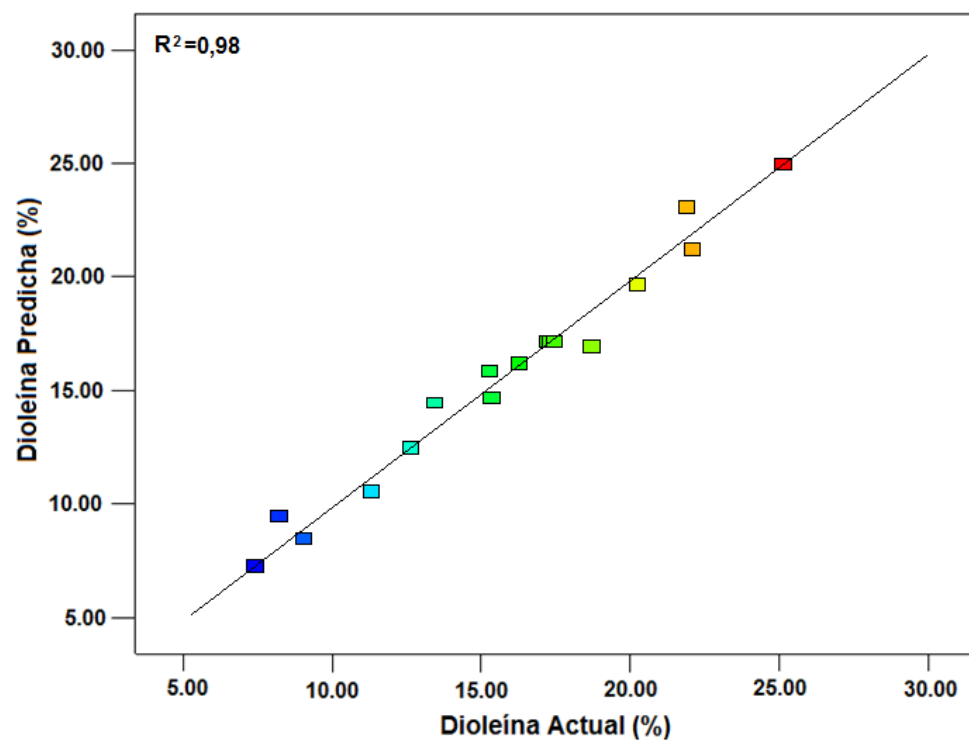
En la Figuras 7.5a, 7.5b, 7.5c y 7.5d se muestran los porcentajes de composición final de la mezcla de reacción experimentales contra los encontrados por los modelos empíricos para cada una de las respuestas evaluadas. Las figuras prueban que los datos de la respuesta predichos por el modelo empírico están de acuerdo con los experimentales en el rango de variables evaluado. Los altos valores de ajuste de datos $R^2=0,95$; $R^2=0,95$; $R^2=0,91$ y $R^2=0,94$ para el porcentaje de trioleína convertida, el porcentaje de monoleína, dioléína y ácido oleico producidos respectivamente, indican que los modelos se ajustaron adecuadamente a los datos observados.



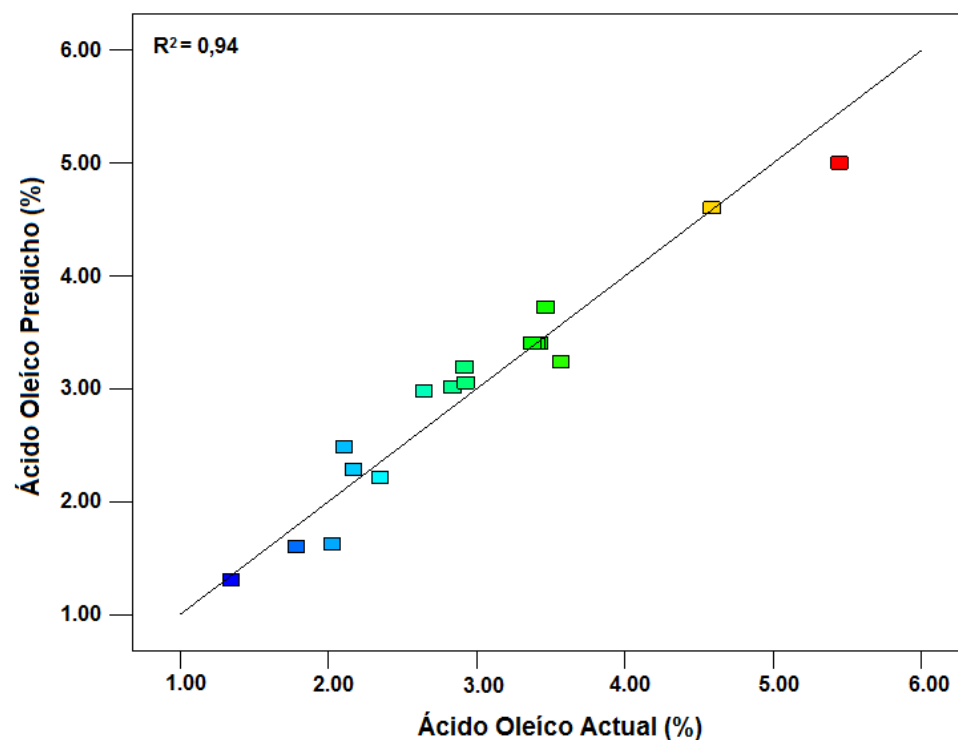
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 7.5 Datos de porcentaje de composiciones finales experimentales contra predichos por el modelo (a) Trioléina (b) Monoléina (c) Dioléina (d) Ácido Oleico

7.2.3 Efecto de los parámetros en la producción de monoleína

Las condiciones de reacción que maximizaron la producción de monoleína fueron encontradas en una región alrededor del punto, actividad de agua, $a_w=0,645$; relación molar de reactivos, Gli/Trio=2,88; y cantidad de proteína en el medio de reacción, Prot=82,28 mg. En la Figura 7.6 se muestra el efecto sobre la producción de monoleína de la actividad de agua y de la relación molar glicerina/trioleína a una cantidad de proteína óptima fija de 82,28 mg. En la Figura 7.7 se muestra el efecto de la relación molar glicerina/trioleína y de la cantidad de proteína a una actividad de agua óptima fija de 0,645. En la Figura 7.8 se muestra el efecto de la actividad de agua y de la cantidad de proteína a una relación molar óptima fija de 2,88.

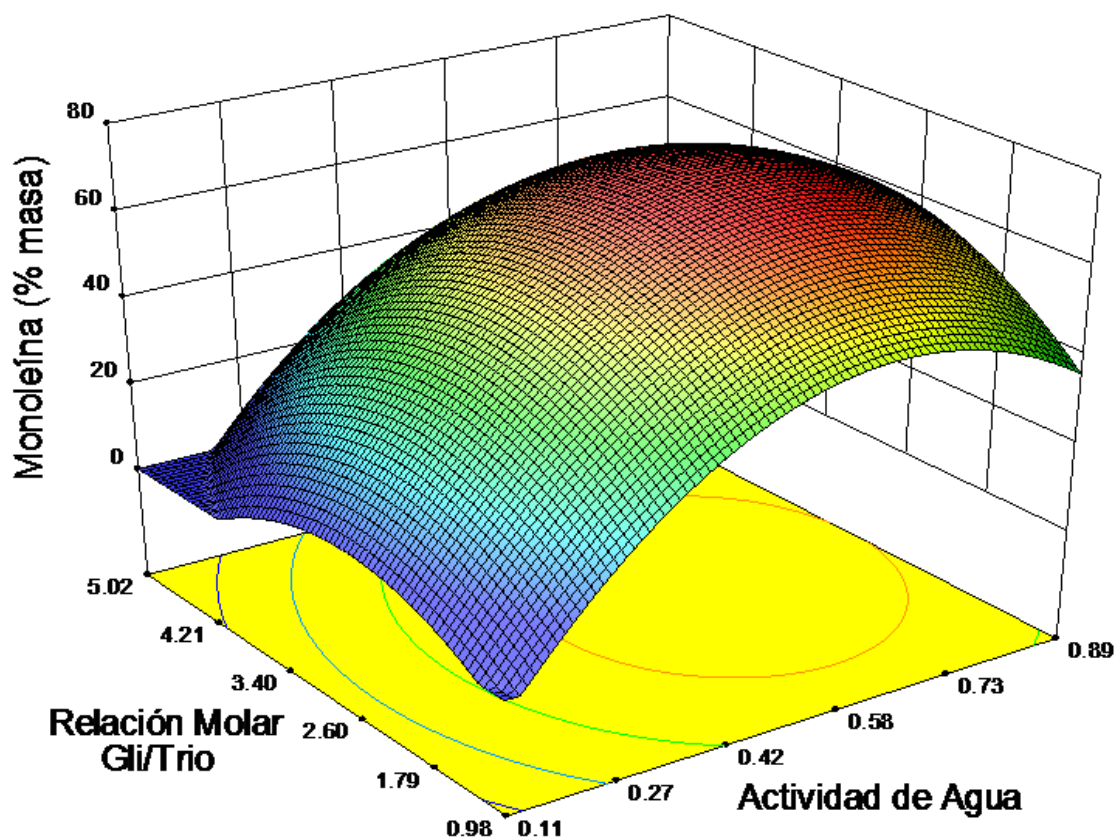


Figura 7.6 Efecto sobre la producción de monoleína de a_w y de Gli/Trio a una cantidad de proteína óptima fija de 82,28 mg

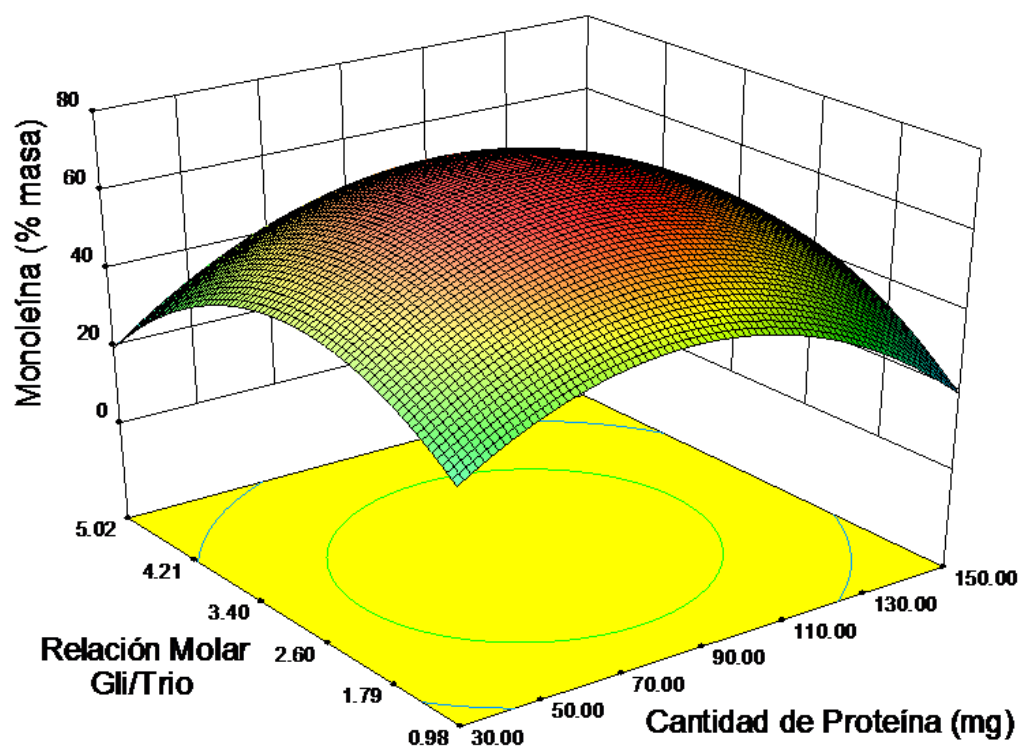


Figura 7.7 Efecto sobre la producción de monoleína de Gli/Trio y Prot a una actividad de agua óptima fija de 0,645

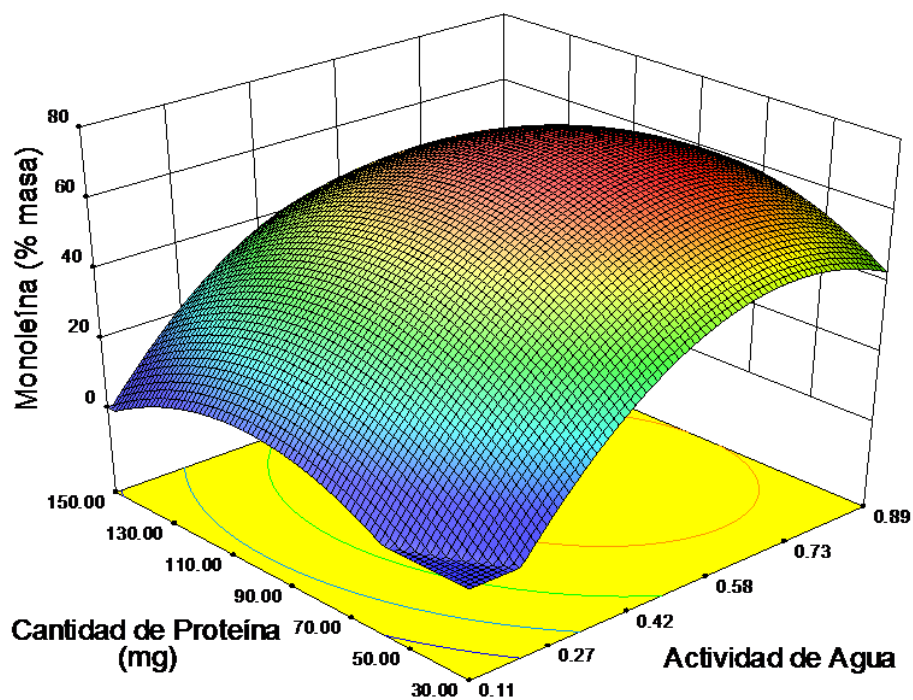


Figura 7.8 Efecto sobre la producción de monoleína de a_w y Prot a una relación molar óptima fija de 2,88.

Como se puede observar, un incremento en la actividad de agua de 0,11 a 0,645 provoca un aumento en la producción de monoleína, sin embargo un incremento superior a este último valor causa una disminución en el rendimiento de monoleína. Es un concepto bien conocido en catálisis enzimática en medio no acuoso que la cantidad de agua disponible en el microambiente que rodea la lipasa es uno de los factores más importantes para que ejerza su función catalítica, y cada tipo de lipasa tiene un rango de actividad de agua óptima [90]. Sin embargo, un exceso de agua en el medio de reacción inhibiría la síntesis y promovería la hidrólisis [36]. En el caso de la glicerólisis de trioleína, tanto la actividad de agua más baja evaluada ($a_w=0,11$) como la actividad de agua más alta ($a_w=0,89$) tuvieron efectos negativos sobre la producción de monoleína. Se observó un pico con máxima producción de monoleína de 71,58% a una $a_w=0,645$ y Gli/Trio=2,88. Este comportamiento de desactivación en los puntos extremos de actividad de agua ha sido también encontrado previamente para la lipasa de *Candida antarctica*, en la reacción de transesterificación de trioleína y etil ferulato [91]. La existencia de una directa correlación entre la actividad de la enzima y la actividad de agua (a_w) del sistema, ha sido claramente demostrada en el caso de la lipasa de *Mucor miehei*, la lipasa mostró un óptimo similar de actividad de agua alrededor de $a_w=0,55$ (cercano al obtenido en este trabajo) cuando fue usada en diferentes solventes variando la polaridad desde hexano a pentanona, las velocidades de reacción variaron dependiendo del solvente, pero la forma del perfil permaneció prácticamente invariable [82].

La relación molar glicerina/trioleína para valores bajos de actividad de agua ($a_w<0,4$) presentó escasa producción de monoleína en todo el rango evaluado, sin embargo para los valores óptimos de actividad de agua (0,502-0,735), el rendimiento de monoleína se incrementó con el aumento de la relación molar de 1 a 2,88, y luego descendió paulatinamente mientras se continuaba aumentando la relación molar de 2,88 a 5. El efecto de la relación molar glicerina/trioleína sobre la producción de monoleína puede ser explicado en dos formas. Por un lado, el aumento en la cantidad de glicerina favorece la conversión de la reacción, debido a que la glicerina actúa como un estabilizador efectivo contra la desnaturalización térmica y por efecto del solvente de la enzima [92]. Así mismo, el aumento de solvente en la mezcla de reacción a bajas concentraciones de glicerina, puede inhibir la actividad de la enzima y disminuir la cantidad de sustrato disponible en la interface entre el solvente y la glicerina [66]. Por otro lado, un exceso en la cantidad de glicerina podría resultar en limitaciones de transferencia de masa y por consiguiente causar la obstrucción del biocatalizador disminuyendo su actividad [17, 93]. Adicionalmente la glicerina por ser de naturaleza altamente hidrofílica puede llegar a remover el agua esencial requerida para conservar a la lipasa en su estado activo. Resultados similares se han encontrado para la producción de monoglicéridos a partir de oleína de palma en sistema de fase sólida, donde se halló la relación molar óptima glicerina/oleína de palma en 2,7 [94].

Para la cantidad de proteína en el medio de reacción, los dos valores extremos evaluados ($Prot=30$ mg y 150 mg) tuvieron un efecto negativo en la producción de monooleína, el valor óptimo que maximizó el rendimiento se encontró en un punto medio $82,28$ mg. Este fenómeno puede deberse a que con muy bajas cantidades de proteína, posiblemente no exista la suficiente superficie de contacto para llevarse a cabo completamente la conversión de los sustratos. Mientras que el bajo rendimiento de la reacción con cantidades demasiado grandes de enzima, podría ser atribuido a una alta resistencia a la transferencia de masa [91].

7.2.4 Efecto de los parámetros en la producción de dioleína

Las condiciones de reacción que maximizaron la producción de dioleína fueron encontradas alrededor del punto, actividad de agua, $a_w=0,82$; relación molar de reactivos, $Gli/Trio=4,14$; y cantidad de proteína en el medio de reacción, $Prot=119,78$ mg. En la Figura 7.9 se muestra el efecto sobre la producción de dioleína de la a_w y $Gli/Trio$ a una cantidad de proteína fija de $119,78$ mg. En la Figura 7.10 se muestra el efecto de $Gli/Trio$ y $Prot$ a una actividad de agua óptima fija de $0,82$. En la Figura 7.11 se muestra el efecto de a_w y de $Prot$ a una relación molar óptima fija de $4,14$.

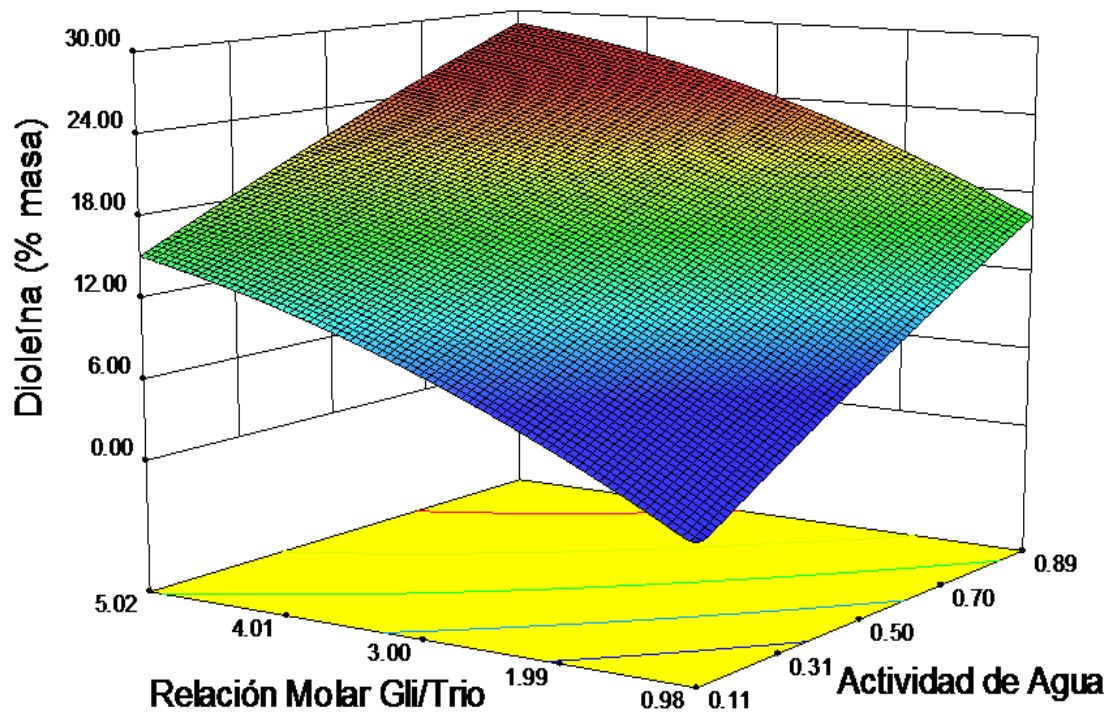


Figura 7.9 Efecto sobre la producción de dioleína de la a_w y $Gli/Trio$ a una cantidad de proteína fija de $119,78$ mg

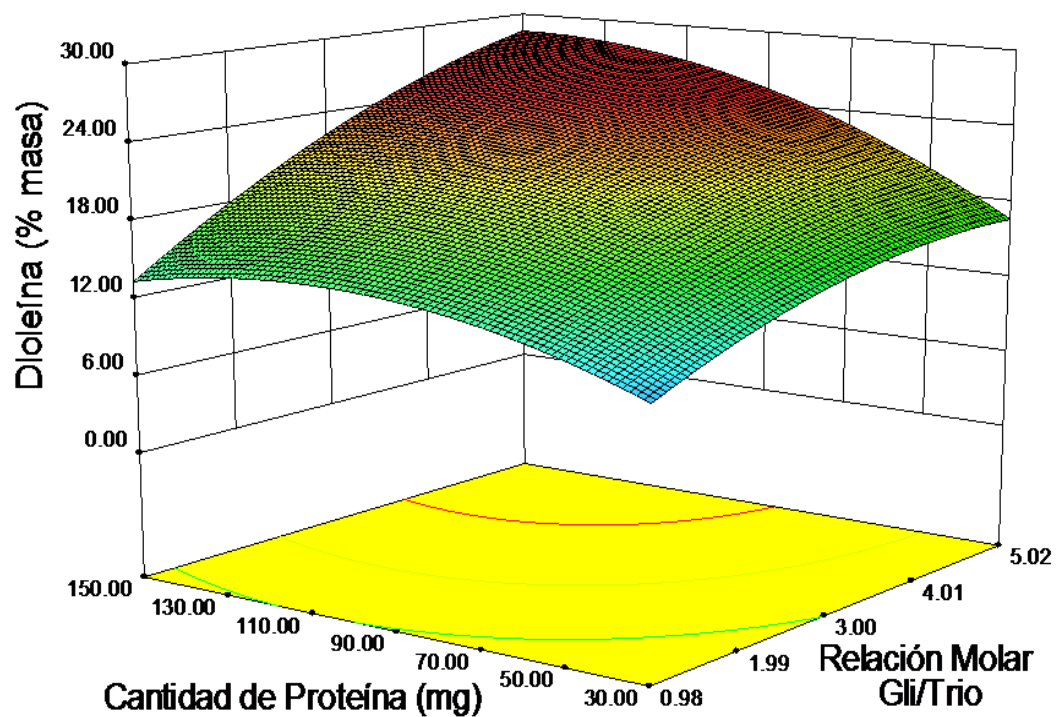


Figura 7.10 Efecto sobre la producción de dioleína de Gli/Trio y Prot a una actividad de agua óptima fija de 0,82

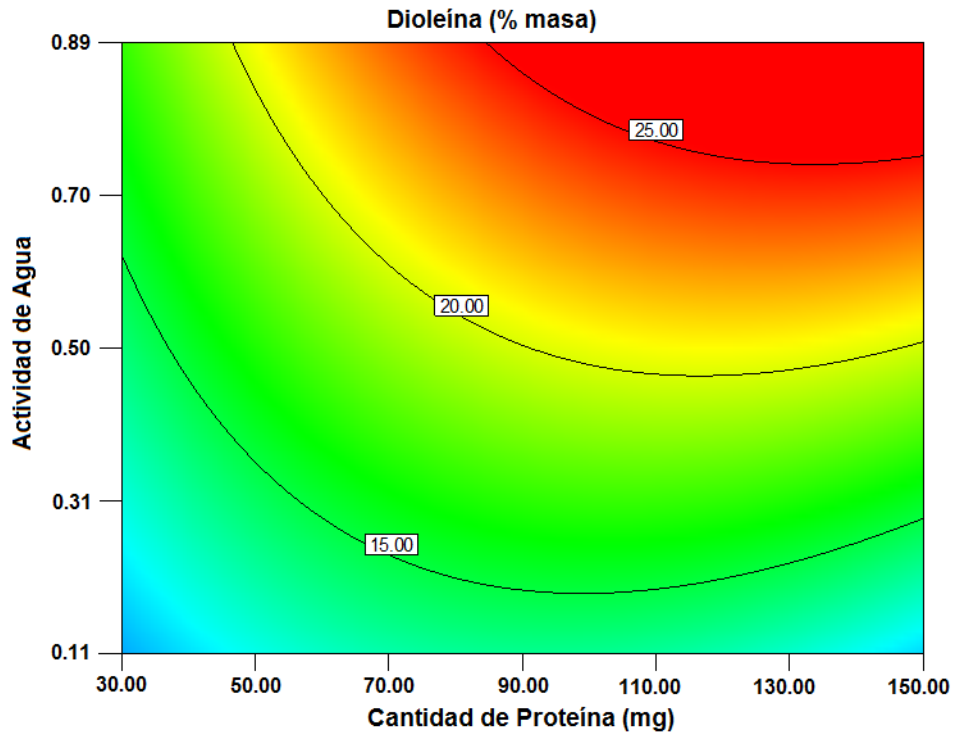


Figura 7.11 Efecto sobre la producción de dioleína de a_w y Prot a una relación molar óptima fija de 4,14

Un incremento en la producción de dioleína se observa con el aumento de la actividad de agua (a_w). Esto puede ser adjudicado probablemente a la reacción de hidrólisis de los glicéridos, debido a que la actividad de agua que presentó la mayor producción de dioleína (26,24%) de 0,82 es demasiado alta para promover la glicerólisis [37, 95]. Una relación directa entre la producción de dioleína y la actividad de agua ha sido encontrada previamente en otros sistemas [37, 96].

La relación molar glicerina/trioleína produjo un efecto positivo sobre la producción de dioleína, se encontró que la mayor producción de dioleína se obtuvo a Gli/Trio=4,14. Este hecho puede ser explicado, teniendo en cuenta que la producción de dioleína se debe principalmente a la reacción de hidrólisis, y ya que la glicerina es altamente hidrofílica y es un potente captador de agua tiene una actividad de agua más alta (aproximadamente $a_w=0,17$) que la del triglicérido que tiene características hidrofóbicas [97-98]. Por lo tanto, el incremento en el contenido de glicerol produce un aumento en la actividad de agua del medio de reacción y, así, se promueve la reacción lateral de hidrólisis.

Se observó un incremento en la producción de dioleína con un aumento en la cantidad de proteína de 30 mg a 119,78 mg, y a valores superiores de este parámetro no se encontró un efecto significativo sobre la respuesta. Este comportamiento ha sido hallado previamente para la glicerólisis de aceite de oliva en n-hexano con lipasa de *Rizhomucor miehei* y de *Candida antarctica* [98].

7.2.5 Efecto de los parámetros en la producción de ácido oleico

Las condiciones de reacción que maximizaron la producción de ácido oleico fueron encontradas alrededor del punto, actividad de agua, $a_w=0,87$; relación molar de reactivos, Gli/Trio=4,29; y cantidad de proteína en el medio de reacción, Prot=143,64 mg. En la Figura 7.12 se muestra el efecto sobre la producción del ácido oleico de la a_w y Gli/Trio a una cantidad de proteína fija de 143,64 mg. En la Figura 7.13 se muestra el efecto de Gli/Trio y Prot a una actividad de agua óptima fija de 0,87. En la Figura 7.14 se muestra el efecto de a_w y de Prot a una relación molar óptima fija de 4,09.

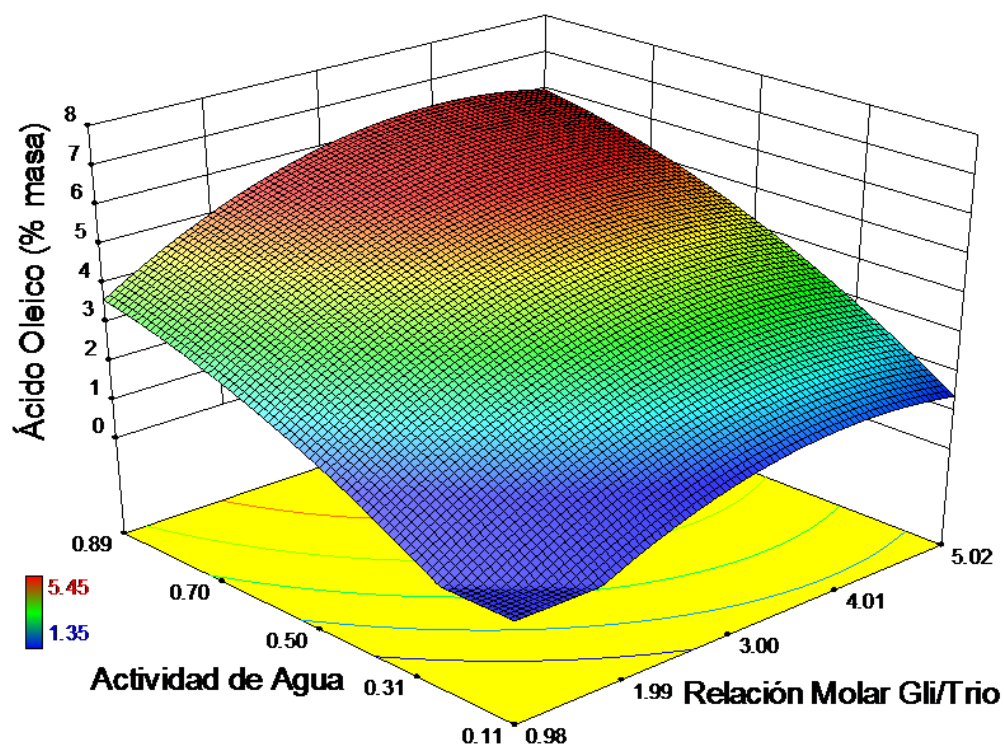


Figura 7.12 Efecto sobre la producción del ácido oleico de la a_w y Gli/Trio a una cantidad de proteína fija de 143,64 mg

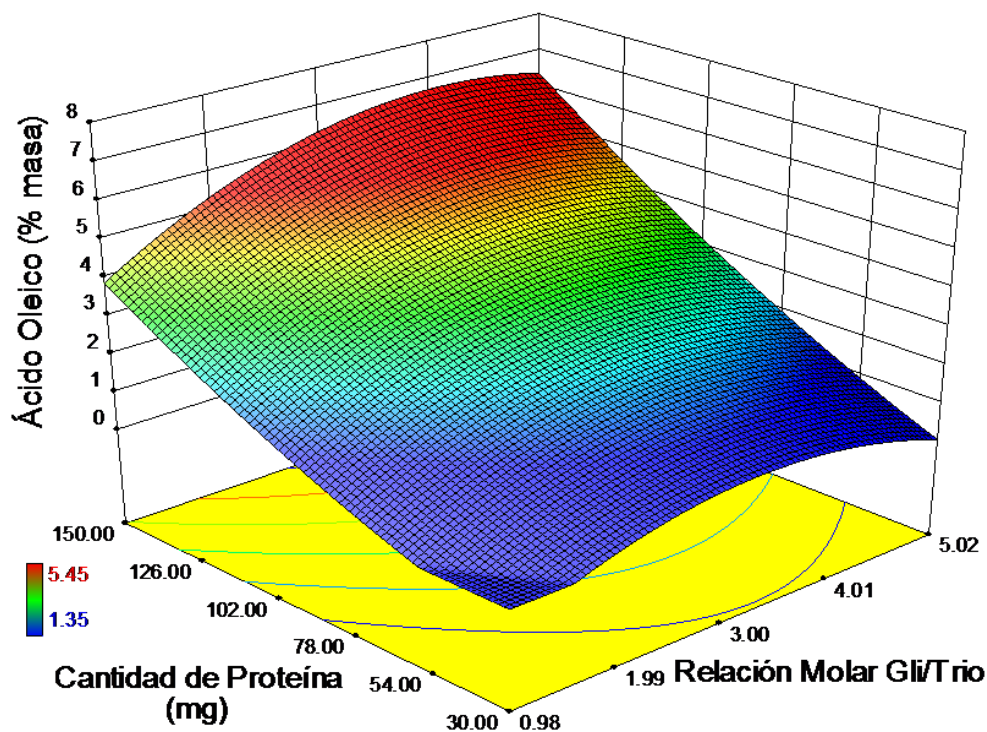


Figura 7.13 Efecto sobre la producción de ácido oleico de Gli/Trio y Prot a una actividad de agua óptima fija de 0,87

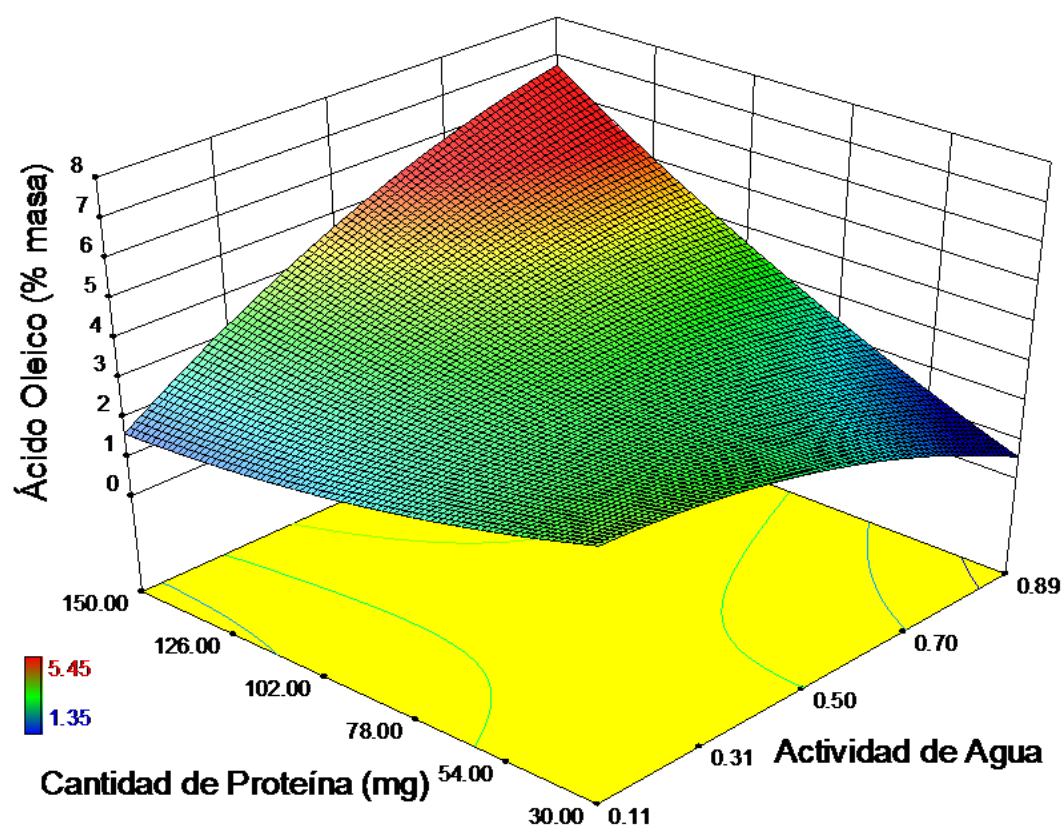


Figura 7.14 Efecto sobre la producción de ácido oleico de a_w y de Prot a una relación molar óptima fija de 4,09

Los ácidos grasos libres son producidos durante la primera etapa de la glicerólisis catalizada por lipasa, donde los ácidos grasos son liberados de los glicéridos al medio de reacción [99]. Se ha reportado que los ácidos grasos libres principalmente resultan de la hidrólisis, aún a bajas actividades de agua [37, 96]. Como es esperado la mayor producción de ácido oleico (5,98%) se obtiene a las actividades de agua más altas ($a_w=0,87$). Este comportamiento ha sido encontrado previamente en la glicerólisis de aceite de oliva en n-hexano catalizada por lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en diferentes espumas hidrofílicas biocompatibles de poliuretano [37].

El incremento en la cantidad de proteína en el medio de reacción hasta Prot=143,64 mg provocó un aumento en la producción de ácido oleico, y valores superiores hasta Prot=150 mg no presentaron un efecto significativo. Una relación directa entre la producción de ácidos grasos libres y la carga de enzima en el medio fue hallada también por Ferreira-Dias *et al.* (2001) en la glicerólisis de aceite de oliva en n-hexano catalizada por Lipozime IM y Novozym 435 [98].

La producción de ácido oleico se incrementó cuando la relación molar glicerina/trioleína aumentó de 1 a 4,09, valores superiores de 4,09 a 5 produjeron

un pequeño descenso en la concentración de ácido oleico. La alta presencia de glicerina en el medio de reacción provoca que haya una mayor disponibilidad de agua en el medio de reacción promoviendo la hidrólisis, sin embargo la disminución en la generación de ácidos grasos a concentraciones muy altas de glicerina, puede implicar una desactivación de la lipasa, debido a la formación de una capa de glicerol alrededor de las partículas del biocatalizador restringiendo el contacto entre la enzima y los sustratos hidrofóbicos (trioleína y dioleína) [98].

7.2.6 Efecto de los parámetros en la conversión de trioleína

Las condiciones de reacción que maximizaron la conversión de trioleína fueron encontradas alrededor del punto, actividad de agua, $a_w=0,73$; relación molar de reactivos, Gli/Trio=3,31; y cantidad de proteína en el medio de reacción, Prot=108,97 mg. En la Figura 7.15 se muestra el efecto sobre la conversión de trioleína de la a_w y Gli/Trio a una cantidad de proteína fija de 108,97 mg. En la Figura 7.16 se muestra el efecto de Gli/Trio y Prot a una actividad de agua óptima fija de 0,73. En la Figura 7.17 se muestra el efecto de a_w y de Prot a una relación molar óptima fija de 3,31.

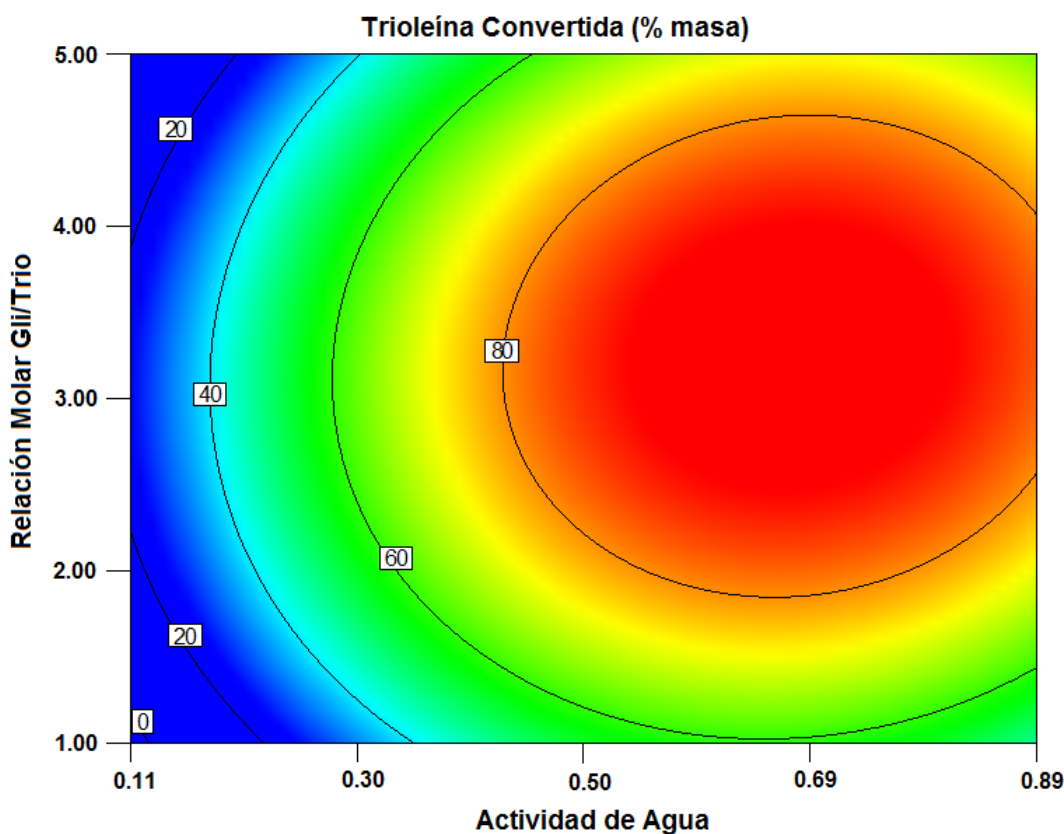


Figura 7.15 Efecto sobre la conversión de trioleína de la a_w y Gli/Trio a una cantidad de proteína fija de 108,97 mg

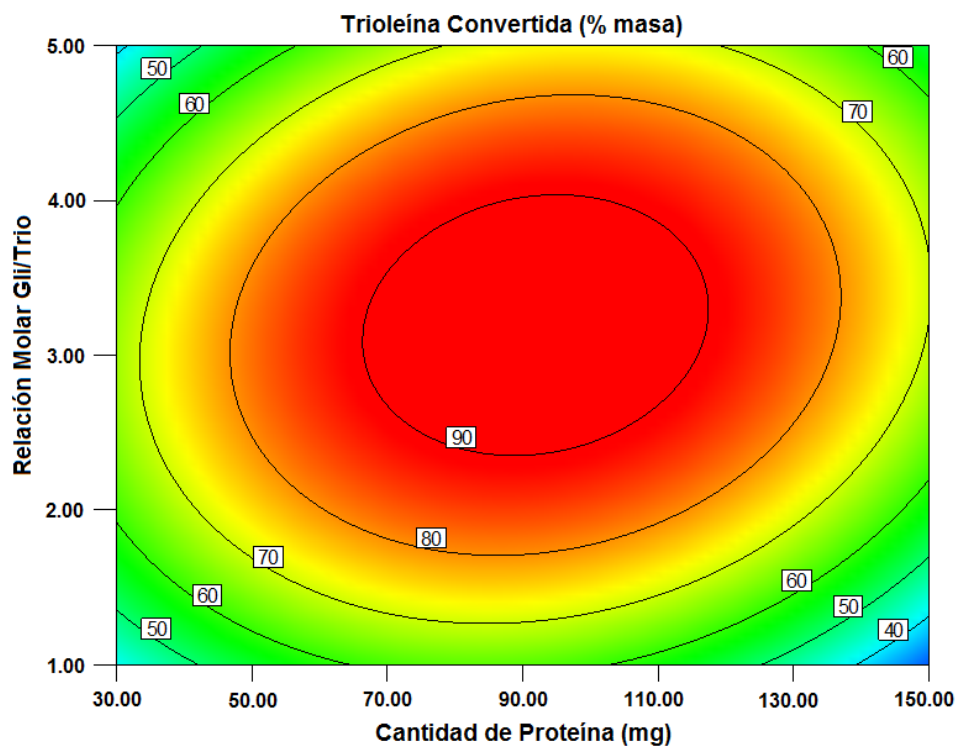


Figura 7.16 Efecto sobre la conversión de trioleína de Gli/Trio y Prot a una actividad de agua óptima fija de 0,73

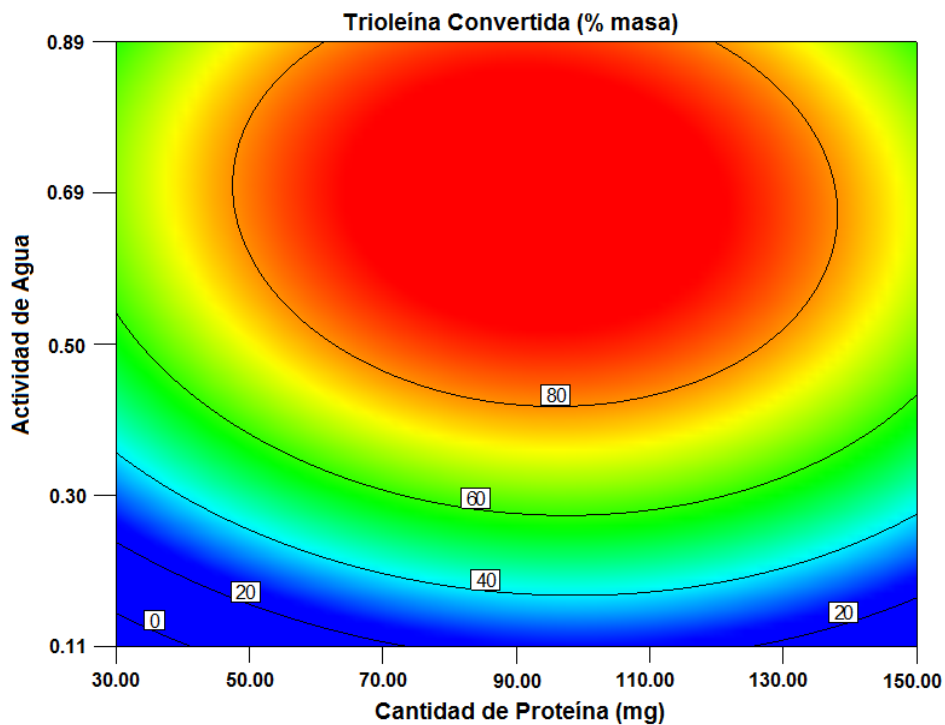


Figura 7.17 Efecto sobre la conversión de trioleína de a_w y de Prot a una relación molar óptima fija de 3,31

Como se observa en las figuras anteriores, existe una región (roja) donde se obtuvieron las máximas conversiones de trioleína (>80%), esta sección está comprendida en el rango de actividad de agua entre $0,53 \leq a_w \leq 0,84$; de relación molar glicerina/trioleína entre $2,45 \leq \text{Gli/Trio} \leq 4,22$; y de cantidad de proteína entre $67,88 \leq \text{Prot} \leq 135,46$ mg. En esta zona están incluidas las condiciones que optimizaron el desarrollo de la glicerólisis y que promovieron la hidrólisis de glicéridos.

Sin embargo el pico más alto de conversión de trioleína, se obtuvo en un punto muy cercano al que maximizó la producción de monoglicéridos, en efecto las superficies que representan la cantidad de trioleína convertida muestran el mismo perfil que las superficies de respuesta para monoleína producida. Esto se debe a que la monoleína se encontró como el producto principal de la reacción.

7.3 Conclusiones

La evaluación del efecto de la actividad de agua inicial del biocatalizador, de la cantidad de proteína en el medio de reacción y de la relación molar glicerina/trioleína sobre la producción de monoleína en la transesterificación de glicerina y trioleína en medio orgánico, mostró que la actividad de agua es el factor que más influencia sobre el rendimiento y la selectividad de la reacción hacia monoglicéridos. Se encontró que cerca a los niveles centrales del rango evaluado para cada variable, se obtuvo la mayor concentración final de monoleína. Específicamente la actividad de agua que optimizó la producción de monoleína, tuvo un valor de 0,502 para los valores experimentales, lo cual se acerca bastante a los datos encontrados en la literatura que reportan que la lipasa de *Mucor miehei* independientemente del medio orgánico empleado presenta un máximo de actividad de agua en 0,55.

En el caso de la producción de dioleína y ácido oleico las mayores concentraciones finales se encontraron cerca a las condiciones más altas evaluadas de actividad de agua, de relación molar y de cantidad de proteína, lo cual puede ser esperado ya que a mayores actividades de agua se promueve la reacción lateral de hidrólisis cuyos productos principales son ácidos grasos libres y dioleína, y en menores proporciones monoleína y glicerina.

8. CONCLUSIONES GENERALES

Mediante la transesterificación de trioleína con glicerina, empleando como catalizador lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada en resina macroporosa de intercambio iónico, y llevando la reacción en un medio orgánico isooctano-acetona, fue posible obtener el productos finales de reacción con un contenido en monoglicéridos de concentraciones superiores (hasta 68,39%) a las del producto comercial (pureza entre el 40-60%).

Para la elección del sistema catalítico, la concentración del medio orgánico y la temperatura más adecuados para llevar a cabo la glicerólisis de trioleína, se evaluó la estabilidad de dos enzimas, lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada en resina de intercambio iónico y lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en quitosano, en diferentes mezclas de acetona-isooctano entre 35° a 45°C. La lipasa de *Mucor miehei* presentó el porcentaje más alto (90%) de retención de la actividad enzimática, a las condiciones de temperatura 35°C y concentración de acetona:isooctano 0,75:0,25 (v:v). La enzima también presentó otra región de alta estabilidad (≈80%) a altas temperaturas y bajas fracciones de acetona (45°C, 0,25). Se escogieron las condiciones de temperatura y medio orgánico, teniendo en cuenta no únicamente el criterio de retención de actividad, si no también criterios económicos según el costo de los solventes, y energéticos según la disminución de gastos de calentamiento, planeando un posible escalamiento del proceso. Por lo tanto se eligieron las condiciones de baja temperatura (35°C) y alta fracción volumétrica de acetona (0,75).

La glicerólisis de trioleína se llevo a cabo empleando la lipasa de *Mucor miehei*, a 35°C en un medio orgánico acetona:isooctano (0,75:0,25), y se evaluó el efecto de la actividad de agua inicial del biocatalizador, la cantidad de enzima inmovilizada en el medio de reacción y la relación molar de los reactivos, sobre la producción de monoleína, dioleína y ácido oleico, y la conversión de trioleína. Se encontró que cerca a los niveles centrales de cada una de las variables evaluadas, se presentaba la mayor producción de monoleína, mientras que en los niveles superiores evaluados se obtuvieron las más elevadas concentraciones de dioleína y ácido oleico.

9. RECOMENDACIONES

Es conveniente realizar un análisis más detallado y posiblemente plantear un nuevo diseño experimental en el rango de las variables evaluadas donde se presentaron los más altos niveles de producción de monoglicéridos, con el fin de encontrar máximos y mínimos locales en esta región y poder hallar con mayor certeza las condiciones óptimas de operación.

En los ensayos de estabilidad en medio orgánico a diferentes temperaturas, se midió la actividad inicial de cada una de las lipasas y la actividad final después de 24 horas en contacto con solventes a una temperatura fija. Sin embargo, para encontrar la vida media del catalizador y conocer la constante de estabilidad térmica, sería necesario realizar el seguimiento de la actividad enzimática a diferentes tiempos de exposición a solventes y temperatura.

Conociendo las condiciones de operación adecuadas para obtener una cantidad apreciable de monoleína en la glicerólisis de trioleína, se podría pensar en el escalamiento del proceso a planta piloto ya sea en continuo o por lotes, empleando bioreactores de lecho empacado y fluidizado, y de mezcla completa. En este caso sería conveniente emplear un diseño experimental para evaluar el efecto de variables de proceso como velocidad de flujo en el caso del proceso en continuo, tiempo de reacción, velocidad de agitación en el caso de un bioreactor de mezcla completa, entre otras.

Con el seguimiento en el tiempo, realizado a las reacciones de glicerólisis de trioleína a diferentes concentraciones de relación molar inicial, es posible encontrar la cinética de la reacción, este procedimiento está en proceso de realización, sin embargo los resultados no son mostrados en este trabajo.

10. REFERENCIAS

1. Proyecciones, D.V., *Dirección de Cadenas Productivas - Dirección de Política Sectorial*. 2009: Madrid.
2. Corma, A., et al., *Lewis and Brönsted basic active sites on solid catalysts and their role in the synthesis of monoglycerides*. Journal of Catalysis, 2005. **234**: p. 340-347.
3. Ying, M., et al., *Microbial production of 1,3-propanediol by Klebsiella pneumoniae using crude glycerol from biodiesel preparations*. Biotechnology letters, 2006. **28**: p. 1755-1759.
4. Chiu, C.W., et al., *Removal of residual catalyst from simulated biodiesel crude glycerol for glycerol hydrogenolysis to propylene glycol*. Ind. Eng. Chem. Res., 2006. **45**: p. 791.
5. Demirel, S., et al., *Oxidation of mono- and polyalcohols with gold: Comparison of carbon and ceria supported catalysts*. Catalysis Today, 2007. **122**: p. 292-300.
6. Rossi, M.P.M., *The future of Glycerol: New usages for a versatile raw Material*. 2008, Cambridge: RSC Publishing.
7. Division, T.S.a.D.A.G.O., *Glycerine: an overview*. 1990: New York. p. 27.
8. Miner, C.S. and N.N. Dalton, *Glycerol*. American Chemical Society Monograph Series. 1953, New York: Reinhold Publishing Company.
9. Carpenter, W.L. and A. Yeatise, *On the Manufacture of Soap and Candles, Lubricants and Glycerin*. 1885, London: E. & E Spon.
10. Cardona, C.A., et al., *Bioglicerol como materia prima para la obtención de productos de alto valor agregado*, in *Avances Investigativos en la Producción de Biodiesel*, C.A. Cardona and C.E. Orrego, Editors. 2009, Gráficas Tizan: Manizales. p. 103-122.
11. *Impacto de la Glicerina como Subproducto de Biodiesel*. 2006 [cited 2008 15 de febrero]; Available from: http://www.esru.strath.ac.uk/EandE/Web_sites/06-07/Biodiesel/glycerines.htm/.
12. Wang, K., M.C. Hawley, and S.J. Deathos, *Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol via Selective Dehydroxylation*. Ind. Eng. Chem. Res., 2003. **42**: p. 2913-2923.
13. Forsberg, C.W., *Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by Clostridium acetobutylicum and Other Clostridium Species*. Applied and Environmental Microbiology, 1987: p. 639-643.
14. Zheng, Y., X. Chen, and Y. Shen, *Commodity Chemicals Derived from Glycerol, an Important Biorefinery Feedstock*. Chem. Rev., 2008. **108**: p. 5253-5277.
15. Douette, A.M.D., et al., *Experimental Investigation of Hydrogen Production from Glycerin Reforming*. Energy & Fuels, 2007. **21**: p. 3499-3504.

16. Congreso de Energías Alternativas. 2005 [cited 2007 4 de octubre]; Available from: <http://weblogs.madrimasd.org/energiasalternativas/archive/2006/06/29/33193.aspx/>.
17. Bellot, J.C., et al., *Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification*. Enzyme and Microbial Technology, 2001. **28**: p. 362-369.
18. Ivanhoe California. 2010 [cited 2010 13 de Abril]; Available from: <http://ivanhoecalifornia.com/a185555-world-emulsifiers-market-to-reach-.cfm>.
19. Lawson, H., *Aceites y Grasas Alimentarias: Tecnología, Utilización y Nutrición*, ed. Acribia. 2000, ColorADO.
20. Kaewthong, W., et al., *Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase*. Process Biochemistry, 2005. **40**: p. 1525-1530.
21. Fisher, W., *Production of High Concentrated Monoglyceride*. 1998, DGF-Symposium: Magdeburg, Germany.
22. Cortéz, A.M., R. Mora, and J.C. Vargas, *Inmovilización de lipasas: estudio de la actividad catalítica en la esterificación de ácidos grasos*. . 2000, Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Ingeniería Química: Bogotá.
23. Moquina, P.H.L., et al., *Kinetic modeling of glycerolysis–hydrolysis of canola oil in supercritical carbon dioxide media using equilibrium data*. Journal of Supercritical Fluids, 2006. **37**: p. 417-424.
24. Malcata, X.F., *Engineering of/with lipases*. 2005, Madrid.
25. Cygler, M. and J.D. Schrag, *Structure and conformational flexibility of Candida rugosa lipase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) /Molecular and Cell Biology of Lipids, 1999. **1441**: p. 205-214.
26. Catoni, E., *Overexpression and protein engineering of Lipase A and B from Geotrichum Candidum CMICC335426*, in *Fakultät Chemie*. 1999, Universität Stuttgart.
27. Domínguez-de-María, P., et al., *Biotechnological applications of Candida antarctica lipase A: State-of-the-art*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005. **37**: p. 36-46.
28. Paiva, A.N., V.M. Balcão, and J. Malcata, *Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases*. Enzyme and Microbial Technology, 2000. **27**: p. 187-204.
29. Vulfson, E.N., *Industrial applications of lipases*, in *Lipases–Their Structure, Biochemistry and Application* P. Woolley and S.B. Petersen, Editors. 1994, Cambridge University Press: Cambridge, UK. p. 271-288.
30. Sharma, R., Y. Chisti, and U.C. Banerjee, *Production, purification, characterization, and applications of lipases*. Biotechnology Advances, 2001. **19**: p. 627-662.

31. Krishna, S.H., *Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media*. Biotechnology Advances, 2002. **20**: p. 239-267.
32. Jaeger, K.E., B.W. Dijkstra, and M.T. Reetz, *Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases*. Annu. Rev. Microbiol., 1999. **53**: p. 315-351.
33. Fernandez-Lafuente, R., et al., *Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports*. Chemistry and Physics of Lipids, 1998. **93**: p. 185-197.
34. Pandey, A., et al., *The realm of microbial lipases in biotechnology*. Biotechnology and applied biochemistry, 1999. **29 (Pt 2)**: p. 119-131.
35. Jaeger, K.E. and T. Eggert, *Lipase for biotechnology*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. **13**: p. 390-397.
36. Gandhi, N.N., et al., *Immobilization of Mucor miehei lipase on ion exchange resins* Chemical Engineering Journal, 1996. **61**: p. 149-156.
37. Ferreira, S.D., A.C. Correia, and M.M.R. Fonseca, *Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by Candida rugosa lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **21**: p. 71-80.
38. Aksoy, H.A. and M. Tuter, *Enzymatic Glycerolysis of Palm and Palm Kernel Oils*. Chem. Eng. Comm. , 2005. **92**: p. 14-17.
39. Balcão, V.M., A.L. Paiva, and F.X. Malcata, *Bioreactors with immobilized lipases: state of the art*. Enzyme and Microbial Technology, 1996. **18**: p. 392-416.
40. Dosanjh, N.S. and J. Kaur, *Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from a Bacillus sp.* Biotechnol. Appl. Biochem., 2002. **36**: p. 7-12.
41. Cetina, D.M., C.E. Orrego, and O.D. Hernández, *Producción enzimática de biodiesel*, in *Avances Investigativos en la Producción de Biocombustibles*, C.A. Cardona and C.E. Orrego, Editors. 2009, Gráficas Tizan: Manizales. p. 19-35.
42. Arroyo, M., *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. Ars Pharmaceutica, 1998. **39**: p. 23-29.
43. Tischer, W. and V. Kasche, *Immobilized enzymes: crystals or carriers?* . Tibtech, 1999. **17**: p. 326-335.
44. Wisdom, R.A., et al., *Enzyme esterification of fats: factors influencing the choice of support for immobilized lipase*. Enzyme Microb. Technol., 1984. **6**: p. 443-446.
45. Ivanov, A.E. and M.P. Schneider, *Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 1997. **3**: p. 303-309.
46. Fadiloglu, S. and Z. Söylemez, *Olive Oil Hydrolysis by Celite-Immobilized Candida rugosa Lipase*. J. Agric. Food Chem., 1998. **46**: p. 3411-3414.
47. Rousseau, D. and A.G. Marangoni, *Tailoring the Textural Attributes of Butter Fat/Canola Oil Blends via Rhizopus arrhizus Lipase-Catalyzed Interesterification. 1. Compositional Modifications.* . J. Agric. Food Chem., 1998. **46**: p. 2368-2374.

48. Khare, S.K. and M. Nakajima, *Immobilization of Rhizopus japonicus lipase on celite and its application for enrichment of docosaheptaenoic acid in soybean oil*. Food Chemistry, 2000. **68**: p. 153-157.
49. Palomo, J.M., et al., *Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2002. **19-20**: p. 279-286.
50. Pereira, E.B., J.M. Zanin, and H.F. Castro, *Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2003. **20**: p. 343-355.
51. Morimoto, M., H. Saimoto, and Y. Shigemasa, *Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification*. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2002. **14**: p. 205-222.
52. Krajewska, B., *Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review*. Enzyme and Microbial Technology, 2004. **35**: p. 126-139.
53. Xu, Y., et al., *Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from Rhizopus chinensis CCTCC M201021 in non-aqueous phase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002. **18**: p. 29-37.
54. Ghanem, A. and H.Y. Aboul-Enein, *Application of lipases in kinetic resolution of racemates*. Chirality, 2005. **17**: p. 1-15.
55. Shah, S., S. Sharma, and M.N. Gupta, *Enzymatic transesterification for biodiesel production*. Indian J. Biochem. Biophys., 2003. **40**: p. 392-399.
56. Muller-Santos, M., et al., *Determination of lipase activity using image analysis*. Anal. Biochem., 2006. **351**: p. 305-307.
57. Kumar, K.S.V., et al., *A sensitive assay for lipase using tetra sulfonatophenyl porphyrin*. Anal. Biochem., 2006. **356**: p. 294-296.
58. Beisson, F., et al., *Methods for lipase detection and assay: A critical review*. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2000. **102**: p. 133-153.
59. Wu, X.Y., S. Jaaskelainen, and Y.Y. Linko, *An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification*. Enzyme Microb. Technol., 1996. **19**: p. 226-231.
60. Torres, M., et al., *Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases*. J. Agric. Food Chem., 2003. **51**: p. 3328-3333.
61. Kiran, K.R., et al., *An esterification method for determination of lipase activity*. Biotechnol. Lett., 2000. **22**: p. 1511-1514.
62. Furutani, T., et al., *Simple screening method for lipase for transesterification in organic solvent*. Enzyme Microb. Technol., 1995. **17**: p. 1067-1072.
63. Maria, P.D.d., et al., *Heptyl oleate synthesis as useful tool to discriminate between lipases, proteases, and other hydrolases in crude preparations*. Enzyme Microb. Technol., 2002. **31**: p. 283-288.
64. Pencreach, G. and J.C. Baratti, *Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the Pseudomonas cepacia lipase: A simple test for the*

- determination of lipase activity in organic media. *Enzyme Microb. Technol.*, 1996. **18**: p. 417-422.
65. Teng, Y. and Y. Xu, *A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent*. *Analytical Biochemistry*, 2007. **363**: p. 297-299.
 66. Kaewthong, W. and A. H-Kittikun, *Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004. **35**: p. 218-222.
 67. Damstrup, M.L., et al., *Solvent Optimization for Efficient Enzymatic Monoacylglycerol Production Based on a Glycerolysis Reaction*. *Journal of American Oil Chemical Society* 2005. **82**: p. 559-564.
 68. Yang, Y.-C., S.R. Vali, and Y.-H. Ju, *A Process for Synthesizing High Purity Monoglyceride*. *J. Chin. Inst. Chem. Engrs.*, 2003. **34**(6): p. 617-623.
 69. Orrego, C.E. and J.S. Valencia, *Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method*. *Bioprocess Biosyst Eng* 2009. **32**: p. 197-206.
 70. Orrego, C.E., J.S. Valencia, and C. Zapata, *Candida rugosa Lipase Supported on High Crystallinity Chitosan as Biocatalyst for the Synthesis of 1-Butyl Oleate*. *Catalysis Letters*, 2009. **129**: p. 312-322.
 71. Orrego, C.E., *Inmovilización de una lipasa en quitosano para uso en esterificación en fase líquida*, in *Facultad de Ciencias-Programa de Doctorado en Ciencias Químicas*. 2009, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
 72. Orrego, C.E., et al., *Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects*. *Carbohydrate Polymers*, 2010. **79**: p. 9-16.
 73. R. M. Robson, D.E. Goll, and M.J. Temple, *Determination of proteins in "Tris" buffer by the biuret reaction*. *Analytic Biochemistry*, 1968. **24**: p. 339-341.
 74. Cifuentes, A.D. and D.M. Rojas, *Inmovilización de lipasa de Candida rugosa en soporte de quitosano*, in *Ingeniería Química*. 2005, Universidad Nacional de Colombia: Manizales.
 75. Cui, Y.M., D.Z. Wei, and J.T. Yu, *Lipase-catalyzed esterification in organic solvent to resolve racemic naproxen*. *Biotechnology Letters*, 1997. **19**: p. 865-868.
 76. Beveridge, G.S.G. and R.S. Schechter, *Optimization: Theory and Practice*. 1970, New York: McGraw-Hill. 317-361.
 77. Box, G.P.G., W.G. Hunter, and J.S. Hunter, *Statistics for Experimenters: An Introduction To Design, Data Analysis And Model Building*. 1978, New York: John Wiley & Sons. 293-352.
 78. Gutierrez, H.P., *Análisis y Diseño de Experimentos*. 1995, Maracaibo.
 79. Yahya, A.R.M., W.A. Anderson, and M. Moo-Young, *Ester synthesis in lipase catalyzed reactions*. *Enzyme Microbiological Technology*, 1998. **23**: p. 438-450.

80. Vermue, M.H. and J. Tramper, *Biocatalysis in non-conventional media: medium engineering aspects*. Pure & Appl. Chem., 1995. **67**(2): p. 345-373.
81. Pereira, E.B., G.M. Zanin, and H.F. Castro, *Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2003. **20**(4): p. 343 - 355.
82. Carrea, G. and S. Riva, *Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents*. Angewandte Chemie International, 2000. **39**: p. 2226-2254.
83. Oguntimain, G.B., W.A. Anderson, and M. Moo-Young, *Synthesis of geraniol esters in a solvent-free system catalyzed by Candida antarctica lipase*. Biotechnol. Lett., 1995. **17**: p. 77-82.
84. Gray, C.J., J.S. Narang, and S.A. Barker, *Immobilization of lipase from Candida cylindraceae and its use in the synthesis of menthol esters by transesterification* Enzyme Microbiological Technology, 1990. **12**: p. 800-807.
85. Hoq, M.M., T. Yamane, and S. Shimizu, *Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor*. Journal of American Oil Chemical Society 1985. **62**: p. 1016–1021.
86. Nawani, N., R. Singh, and J. Kaur, *Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic Bacillus sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme*. Electronic Journal of Biotechnology, 2006. **9**(5): p. 559-565.
87. Rahman, S., *Food Properties Handbook*. 1995, New York.
88. Rockland, L.B., *Analitical Chemistry*. Vol. 32. 1960.
89. Lowry, R.R. and I.J. Tinsley, *Rapid Colorimetric Determination of Free Fatty Acids*. Journal of American Oil Chemical Society, 1976. **53**: p. 470-472.
90. Yang, K., Y.J. Wang, and M.I. Kuo, *Effects of substrate pretreatment and water activity on lipase-catalyzed cellulose acetylation in organic medio* Biotechnol. Prog., 2004. **20**: p. 1053-1061.
91. Zheng, Y., et al., *Dual response surface-optimized process for feruloylated diacylglycerols by selective lipase-catalyzed transesterfication in solvent free system* Bioresource Technology, 2009. **100**: p. 2896-2901.
92. Yang, D. and J.S. Rhee, *Stability of the lipase immobilized on DEAE-sephadex for continuous lipid hydrolysis in organic solvent*. Biotechnol. Lett., 1991. **13**: p. 553-558.
93. Rendón, X., A. López-Munguía, and E. Castillo, *Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of triolein*. Journal of American Oil Chemical Society, 2001. **78**(10): p. 1061-1066.
94. Bornscheuer, U.T. and T. Yamane, *Activity and stability of lipase in the solid-phase glycerolysis of triolein*. Enzyme and Microbial Technology, 1994. **16**: p. 864-869.
95. Halling, P.J., *Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis*. Enzyme and Microbial Technology, 1994. **16**(3): p. 178-206.

96. Kyotani, S., et al., *Interesterification of fats and oils by immobilized fungus at constant water concentration*. Journal of Fermentation Technology, 1988. **66**(5): p. 567-575.
97. Touraine, F. and R. Drapron, *Influence of water activity on glyceride and glycerol ester synthesis by lipase from Rhizopus arrhizus*. Can. Inst. Food Sci. Technol., 1988. **21**: p. 255-259.
98. Ferreira-Dias, S., et al., *Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001. **11**: p. 699-711.
99. Ferreira-Dias, S. and M.M.R.d. Fonseca, *Production of Monoglycerides by Glycerolysis of Olive Oil with Immobilized Lipases: Effect of the Water Activity*. Bioprocess Eng. , 1995. **12**: p. 327-337.

11. ANEXO 1. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS

11.1 Método Biuret. Carga de Proteína

Para el cálculo de la cantidad de proteína se realizó con anterioridad una curva patrón con albúmina bovina, que relacionara la concentración de proteína y la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. La curva patrón empleada se muestra en la Figura 11.1.

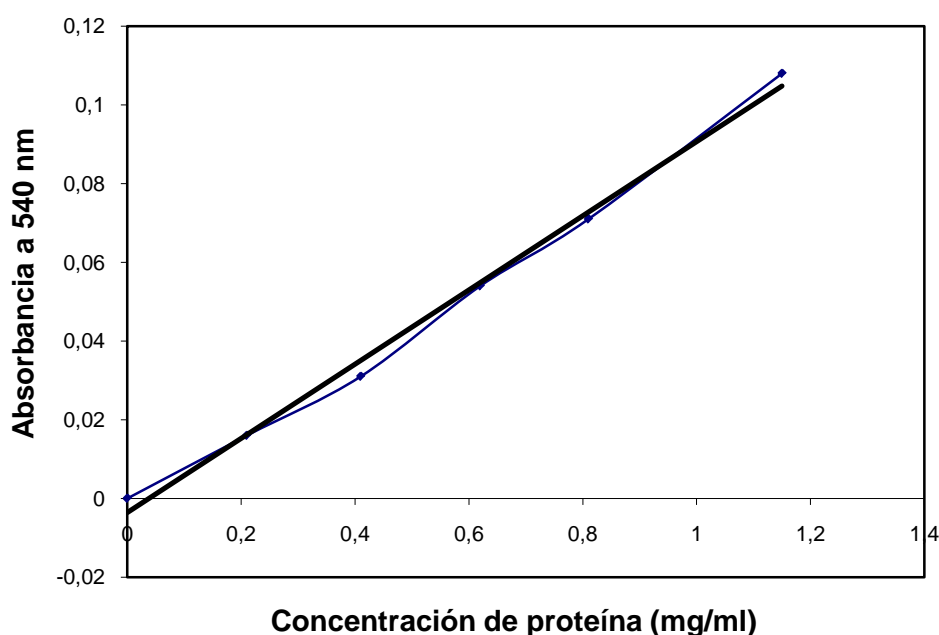


Figura 11.1 Curva patrón para el cálculo de la carga de proteína en el soporte de quitosano

Se realizó la regresión lineal con una correlación de $R^2=0,9944$ y se encontró la siguiente relación entre absorbancia y concentración de proteína:

$$\text{Concentración de proteína} = (\text{Absorbancia} + 0,0036)/0,0943$$

11.2 Actividad Enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática usando el método de transesterificación de pNPP se construyó una curva patrón que relacionara la concentración de pNP y la absorbancia a 410 nm de longitud de onda. Para ello se emplearon soluciones estándar de pNP en heptano y se realizó la extracción con NaOH 1 M acuosa que se describió anteriormente en la sección 5.1.2. La curva se realizó por duplicado para corroborar la reproducibilidad de los resultados y se muestra en la Figura 11.2.

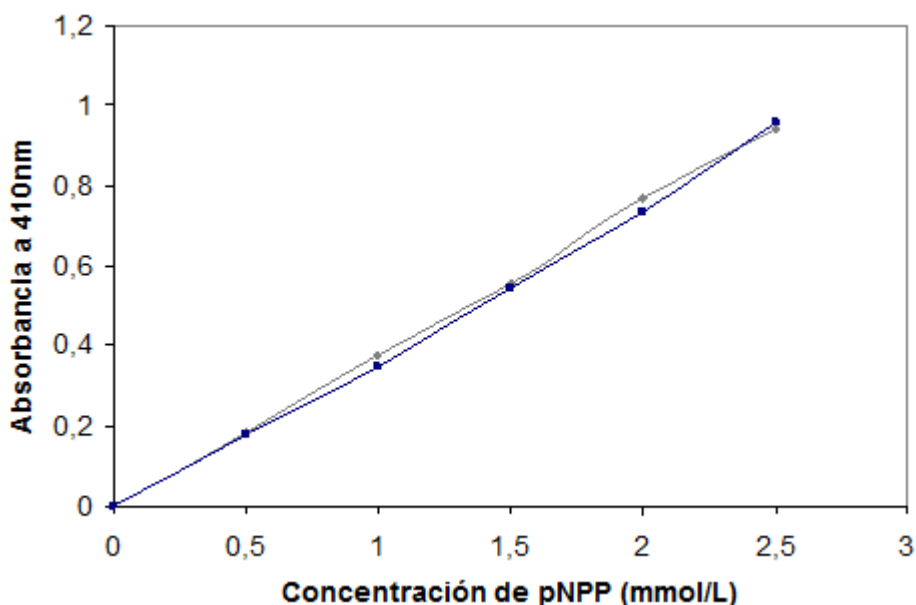


Figura 11.2 Curva patrón para determinar la actividad enzimática de las lipasas en estudio a partir de la transesterificación de pNPP.

Se realizó la regresión lineal con una correlación de $R^2=0,9987$ y se encontró la siguiente relación entre absorbancia y concentración de pNP:

$$\text{Concentración de pNP} = (\text{Absorbancia} - 0,0047) / 0,3806$$

11.3 Ácidos Grasos Libres

Para la determinación de los ácidos grasos libres se realizó con anterioridad una curva patrón, que relacionara la concentración de ácido oleico con la absorbancia a 715 nm de longitud de onda. Para ello se emplearon muestras de estándar de ácido oleico (99,9%) y se realizó el proceso descrito previamente en sección 7.1.5. La curva patrón para la determinación de ácido oleico se muestra en la Figura 11.3.

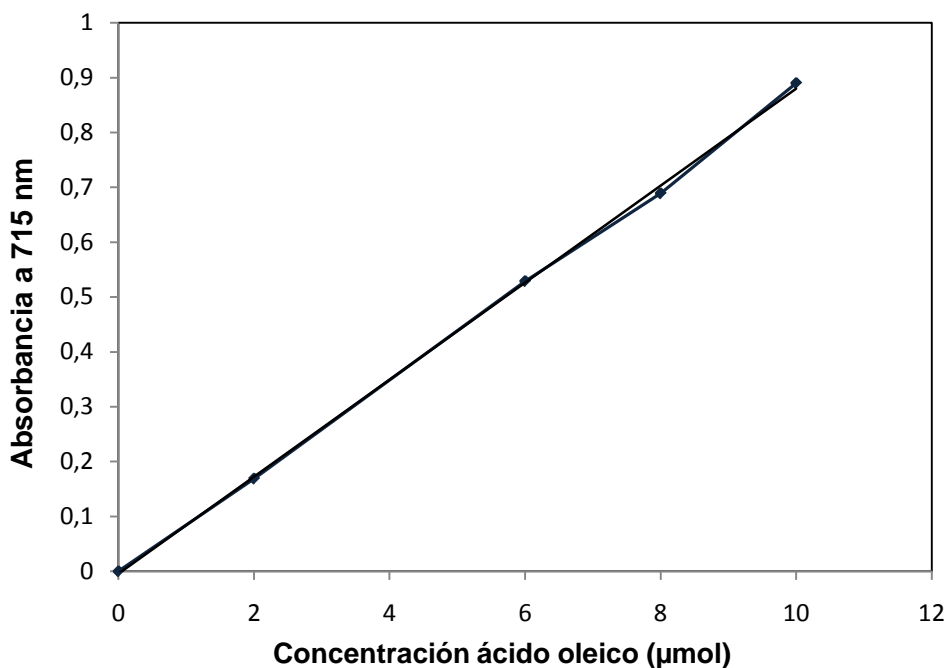


Figura 11.3 Curva patrón para identificación de ácido oleico

Se realizó la regresión lineal con una correlación de $R^2=0,9994$ y se encontró la siguiente relación entre absorbancia y concentración de ácido oleico:

$$\text{Concentración de ácido oleico} = (\text{Absorbancia} + 0,0044)/0,0884$$

12. ANEXO 2. SEGUIMIENTO DE LAS REACCIONES DE GLICERÓLISIS

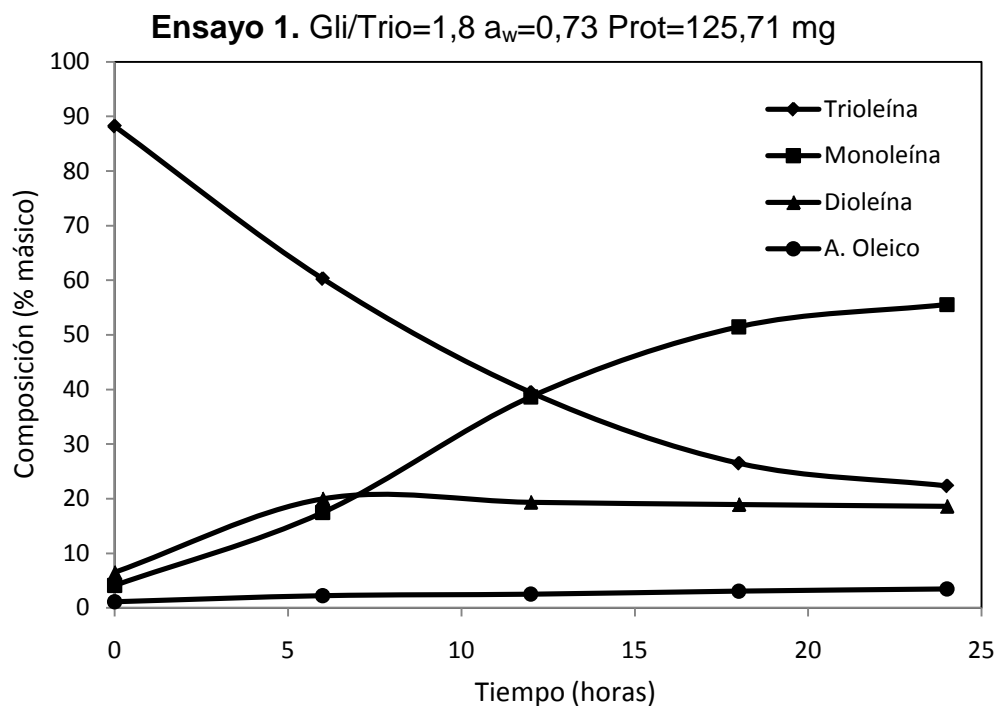


Figura 12.1 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,73$, Gli/Trio=1,8 y Prot=125,71 mg.

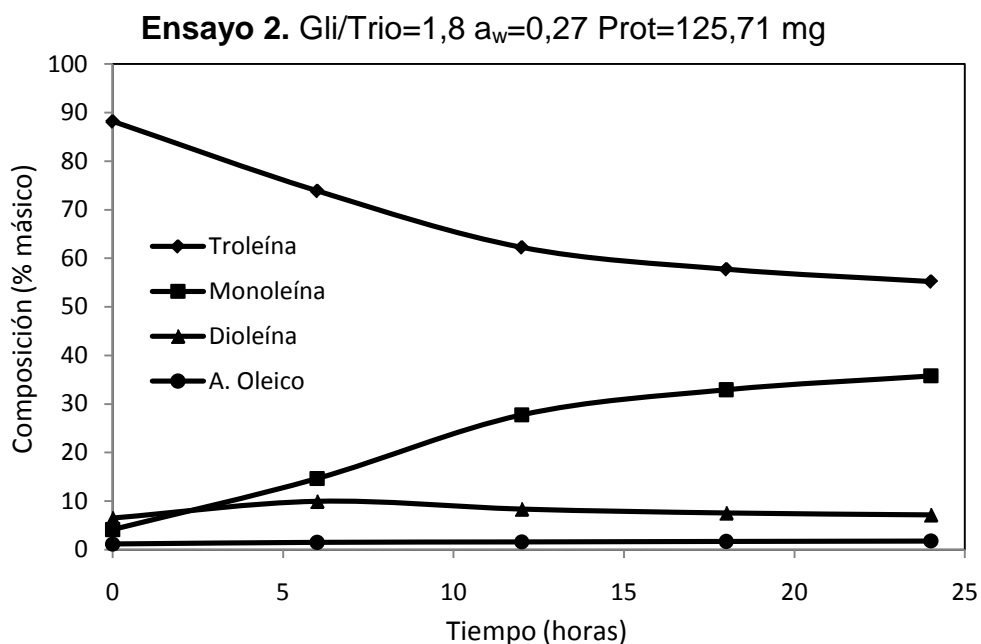


Figura 12.2 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,27$, Gli/Trio=1,8 y Prot=125,71 mg.

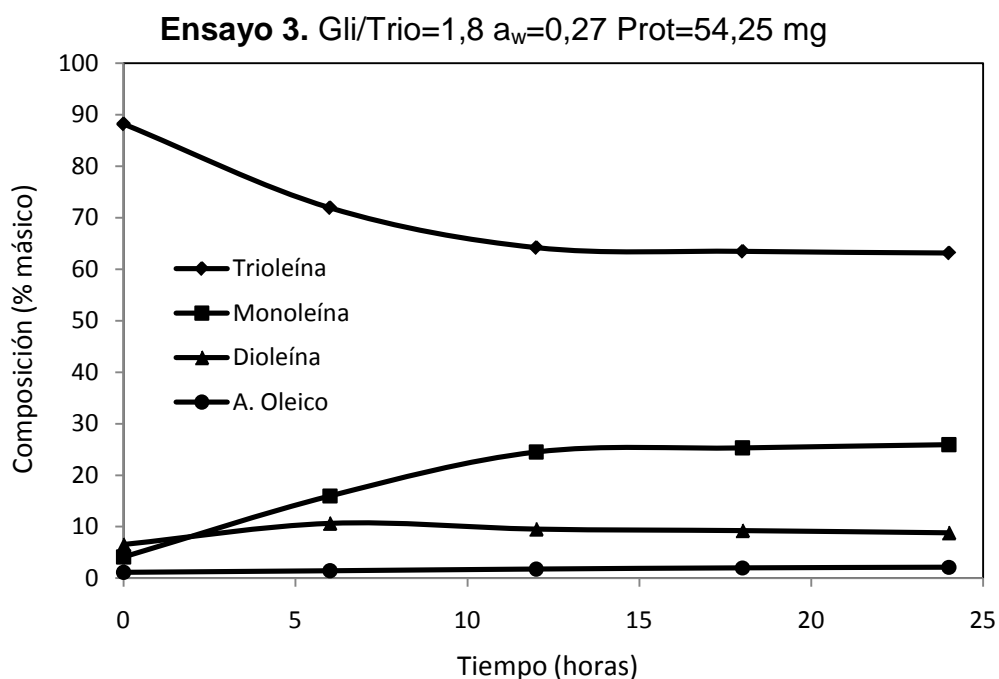


Figura 12.3 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,27$, Gli/Trio=1,8 y Prot=54,25 mg.

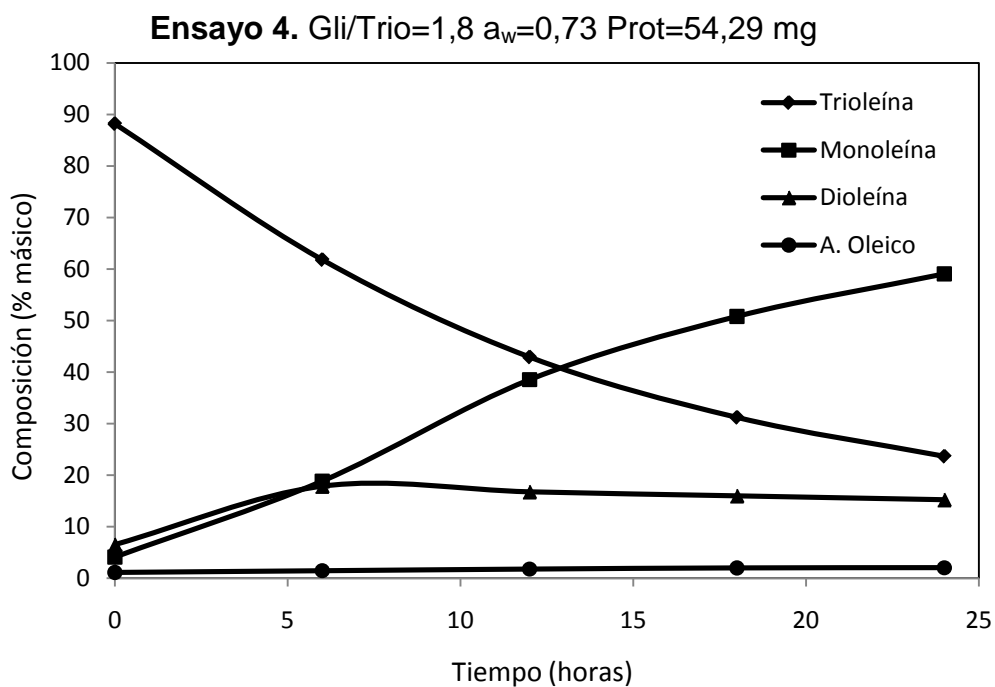


Figura 12.4 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de a_w =0,73, Gli/Trio=1,8 y Prot=54,29 mg.

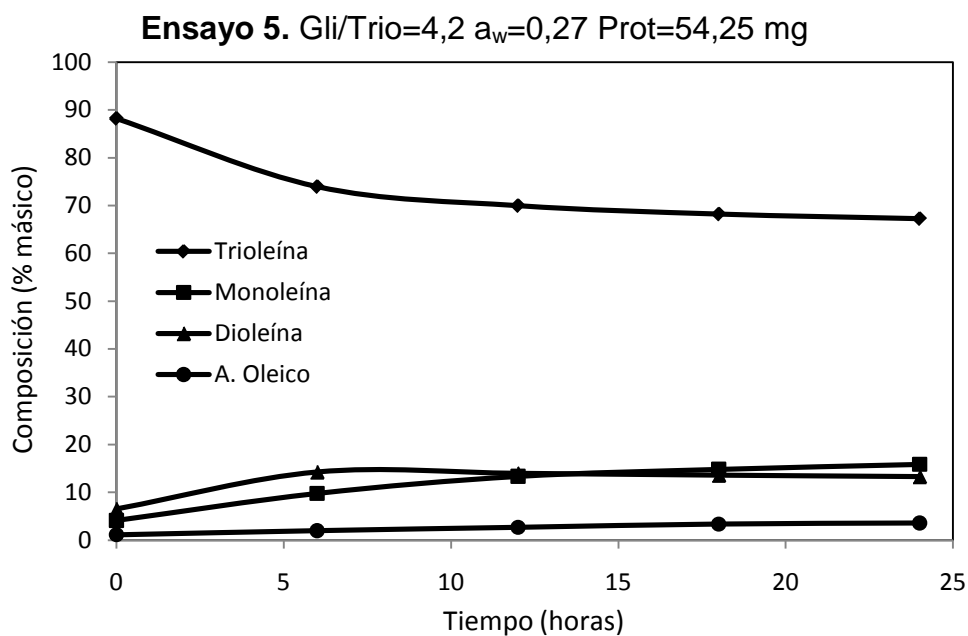


Figura 12.5 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de a_w =0,27, Gli/Trio=4,2 y Prot=54,25 mg.

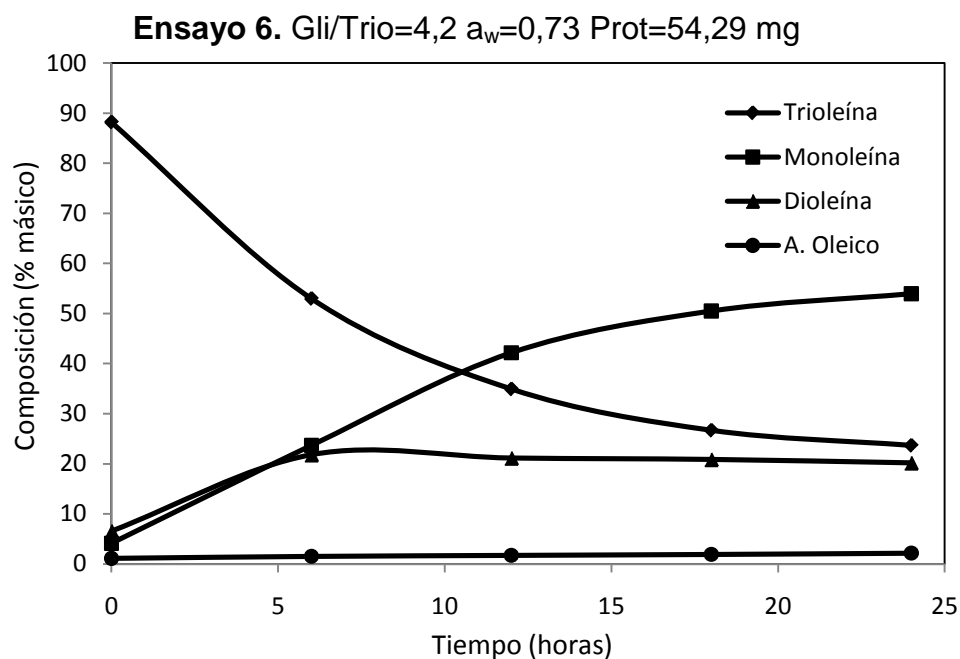


Figura 12.6 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,73$, Gli/Trio=4,2 y Prot=54,29 mg.

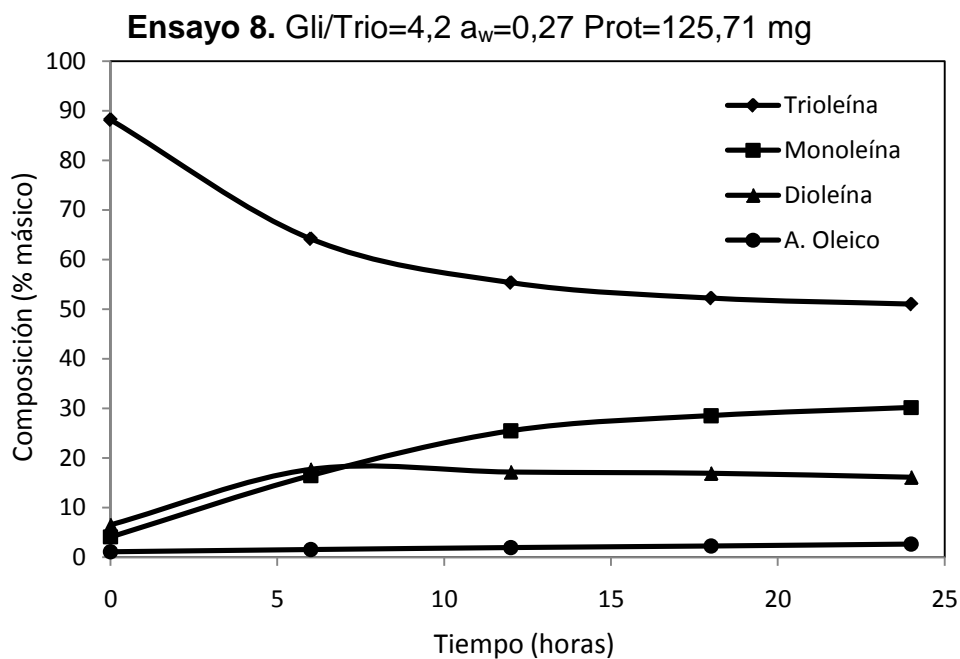


Figura 12.7 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,27$, Gli/Trio=4,2 y Prot=125,71 mg.

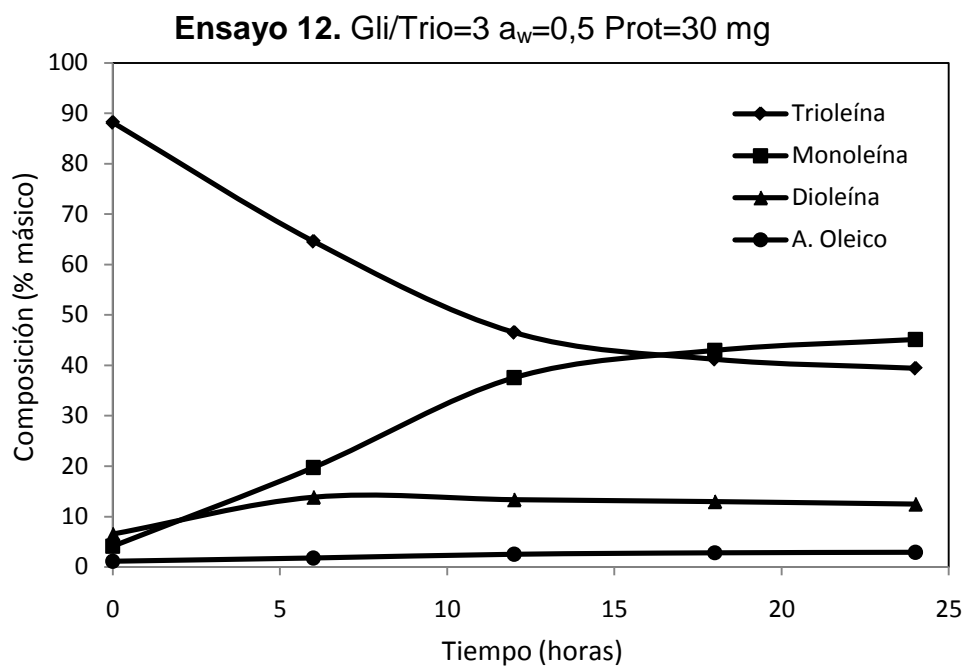


Figura 12.8 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,5$, Gli/Trio=3 y Prot=30 mg.

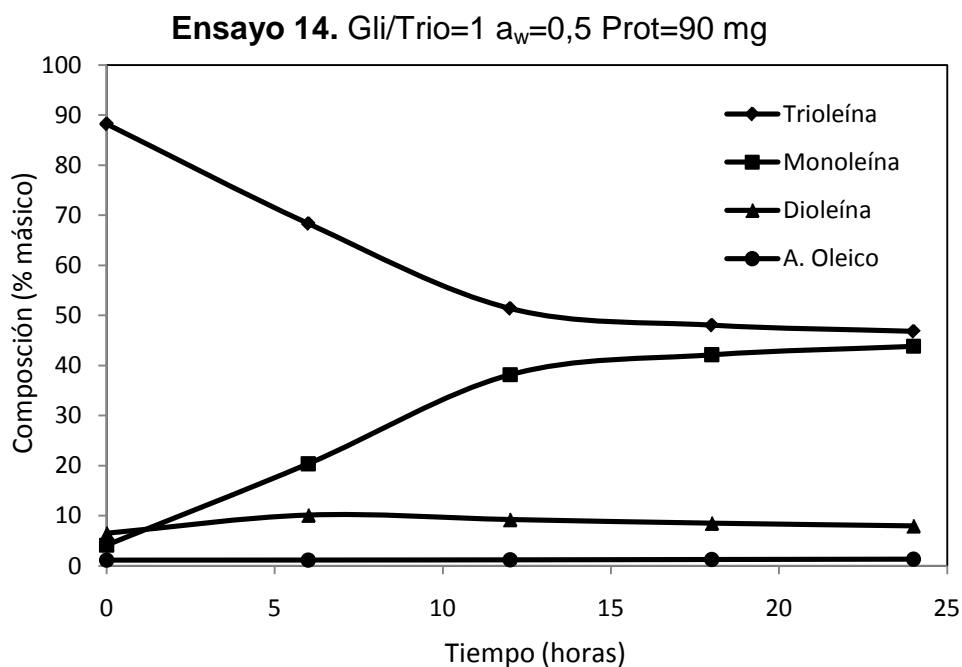


Figura 12.9 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,5$, Gli/Trio=1 y Prot=90 mg.

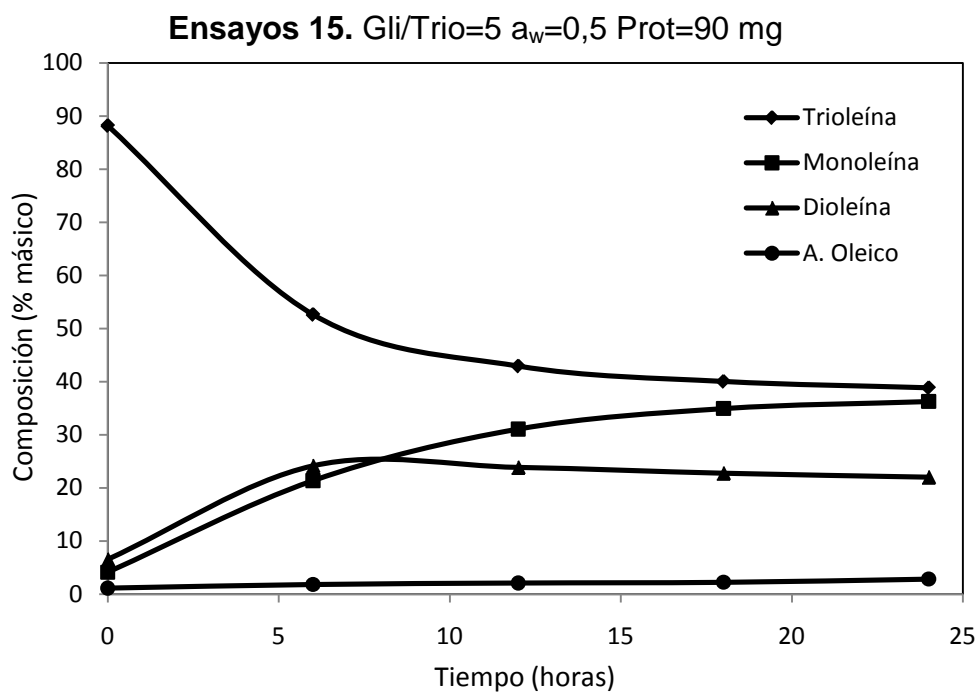


Figura 12.10 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,5$, Gli/Trio=5 y Prot=90 mg.

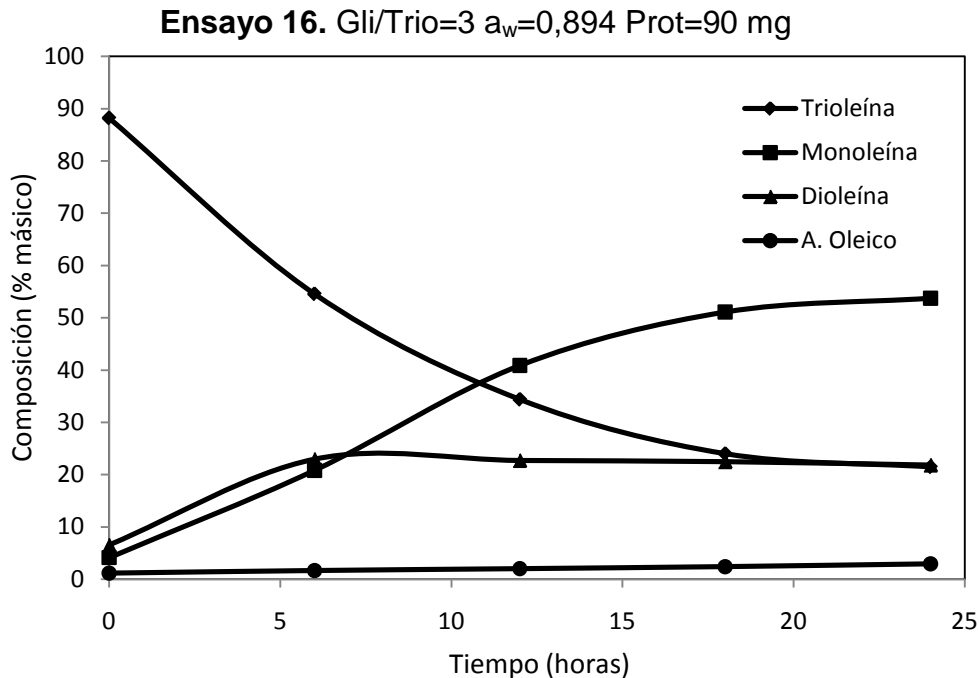


Figura 12.11 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,894$, Gli/Trio=3 y Prot=90 mg.

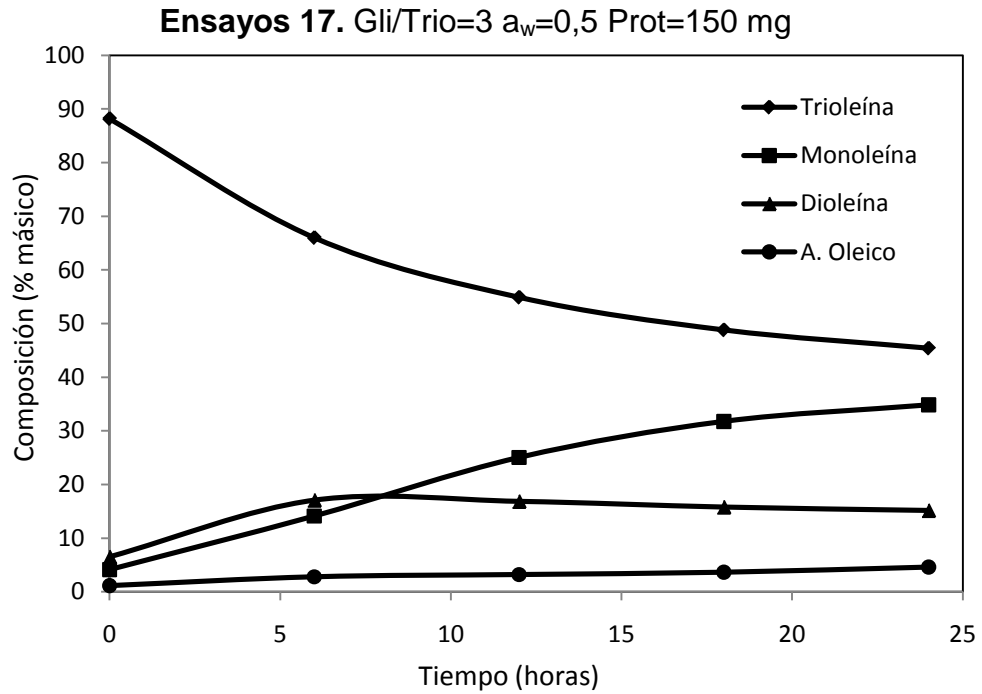


Figura 12.12 Composición de la mezcla de reacción durante la glicerólisis de trioleína con lipasa de *Mucor miehei* de $a_w=0,5$, Gli/Trio=3 y Prot=150 mg.